

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

**Die Beeinflussung
der Pyridinnucleotid-Systeme der Leber
durch die Metabolisierung von Fremdstoffen
und ihre Beziehung zur Synthese von Zellbausteinen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Bosch
aus Wuppertal

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Schmid

**Die Beeinflussung
der Pyridinnucleotid-Systeme der Leber
durch die Metabolisierung von Fremdstoffen
und ihre Beziehung zur Synthese von Zellbausteinen**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Gerhard Bosch

aus Wuppertal

Marburg 1967



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 26. 1. 1967
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof.Dr.med.et med.dent. H.Heuser
Referent: Doz. Dr. H.W. Kunz
Correferent: Prof. Dr. W.Schmid

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>A. Einleitung</u>	7
<u>B. Methodik</u>	9
I. Tiermaterial und Applikationsweise	9
II. Gewebeentnahme und Extraktion	9
1. Gewebeentnahme	9
2. Perchlorsäure-Extraktion zur Bestimmung von DPN, TPN und freien Nucleotiden	9
3. alkalische Extraktion zur Bestimmung von DPNH und TPNH	10
a) mit Natronlauge	10
b) mit alkoholischer Kalilauge	10
III. Bestimmung der Pyridinucleotidgehalte	11
1. Bestimmung von DPN und TPN	11
2. Bestimmung von DPNH und TPNH	11
IV. Bestimmung der Pyridinnucleotide in Zellfraktionen	12
1. Zellfraktionierung	12
2. Extraktion und Bestimmung der Pyridin= nucleotide	13
V. Bestimmung von Glucose-6-Phosphat	13
VI. Bestimmung der freien Nucleotide	13
VII. Bestimmung der Nucleinsäuren	14
1. Bestimmung der Gesamtnucleinsäuren, Orcin-Reaktion	14
2. Diphenylaminreaktion (Dische) zur Bestimmung der DNS	15
VIII. Proteinbestimmung nach der Biuretmethode	15
IX. Bestimmung des O ₂ -Verbrauches in der Warburg-Apparatur	16

X. Bestimmung von $C^{14}O_2$	17
1. Bestimmung der Dekarboxylierungsrate von different markierter Glucose	17
2. Bestimmung von $C^{14}O_2$ nach der Barium= karbonat-Methode	17
XI. Statistische Berechnung	18

C. Ergebnisse

I. Beeinflussung des extramitochondrialen TPN- Umsatzes der Leberzelle durch die Metaboli= sierung von Fremdstoffen	19
1. Der extramitochondriale TPN- Umsatz in der Leber unbehandelter Tiere	20
2. Die Beeinflussung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes der Leberzelle nach Applikation von Pharmaka in vitro	20
3. Die Beeinflussung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes der Leberzelle nach Applikation in vivo	22
a. einmalige Applikation	22
b. chronische Applikation	23
4. Beeinflussung des O_2 -Verbrauchs der Leber= zelle durch Einwirkung von Pharmaka	26
a. Applikation in vitro	26
b. Applikation in vivo	26
II. Beeinflussung der stationären TPN-Konzentra= tionen und der Redoxlage des TPN/TPNH-Systems durch die Metabolisierung von Pharmaka	28
1. Stationäre Pyridinnucleotidgehalte und Redoxlage des TPN-Systems in der Leber unbehandelter Tiere	29
a. Abhängigkeit der Pyridinnucleotidgehalte und der Redoxlage vom Alter der Tiere	29
b. Tages- und jahresperiodische Schwankungen der Pyridinnucleotidgehalte in der Mäuseleber	31

2. Beeinflussung der Redoxlage des TPN-Systems durch einmalige Applikation von Pharmaka	32
3. Beeinflussung der Redoxlage des TPN-Systems durch chronische Einwirkung von Pharmaka	34
4. Beeinflussung der Glucose-6-phosphat-Gehalte der Leber durch die Applikation von Pharmaka	41
III. Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Veränderung des extramitochondrialen TPN-Systems und der Synthese von freien Nucleotiden, Nucleinsäuren und Protein bei der pharmakainduzierten Lebervergrößerung	44
1. Luminal	45
2. Halothan	50
3. Dimethylnitrosamin	53
<u>D. Diskussion der Ergebnisse</u>	56
<u>E. Zusammenfassung</u>	63
<u>F. Literaturverzeichnis</u>	66
<u>G. Tabellenanhang</u>	

A. Einleitung

Chronische Zufuhr zahlreicher Pharmaka mit sehr unterschiedlichen chemischen und biologischen Eigenschaften führt bei Ratte und Maus zu einer beträchtlichen Lebervergrößerung (6, 11, 21, 37). Nach der Feststellung REMMERS (30, 29), daß Pharmaka eine Vermehrung der endoplasmatischen Strukturen der Leberzelle induzieren, wurde die durch Fremdstoffe ausgelöste Lebervergrößerung allgemein als ein Äquivalent der Mikrosomenvermehrung betrachtet. Da die vor allem bei Ratten beobachtete Organzunahme 10 bis 20 Prozent der Normalgewichte betrug, schien diese Deutung berechtigt.

Bei Untersuchungen über die zellphysiologischen Folgen einer starken Beanspruchung der mikrosomalen Metabolisierungssysteme wurde jedoch beobachtet, daß bei der weißen Maus nach Applikation von Barbituraten und Halogenkohlenwasserstoffen eine Lebervergrößerung von bis zu 100 Prozent auftreten kann (18). Organvergrößerungen dieses Ausmaßes waren nicht mehr mit einer alleinigen Vermehrung der "smooth membranes" zu erklären. Da in biochemischen Analysen eine dem Wachstum parallel laufende Zunahme von Protein und Nucleinsäuregehalten gefunden wurde (HOOPS) und histologische Untersuchungen eine Hypertrophie der Zellen ohne hydropische Schwellung und Verfettung (SIESS 34) ergaben, war anzunehmen, daß dieser Organvergrößerung echtes Wachstum zugrunde liegt.

Damit war das Phänomen von außerordentlichem methodischen Wert für die experimentelle Untersuchung der Induktions- und Regulationsmechanismen von Zellwachstum und Zellvermehrung. Im Unterschied zu anderen Wachstumsmodellen, wie etwa der Teilhepatektomie, sind bei der pharmakainduzierten Lebervergrößerung der Beginn der Kausalkette definiert und die anschließenden Reaktionsglieder weitgehend überschaubar.

Als eigentlicher Auslösemechanismus kommt nur eine allen wirksamen Stoffen gemeinsame, biochemische Eigenschaft in Betracht. Alle wachstumsinduzierenden Pharmaka stellen Substrate der mikrosomalen Metabolisierungssysteme der Leber dar. Andere Stoffwechselwirkungen, wie vor allem die Hemmung des Oxydations=

stoffwechsels oder die Entkopplung der Atmungskette, besitzen nur einige der wirksamen Substanzen. Wachstumsinduzierende und auf diese Vorgänge wirksame Dosen sind zudem um Größenordnungen verschieden.

Es schien daher sinnvoll, bei dem Versuch einer Analyse des durch Pharmaka induzierten Wachstums von der Annahme einer kausalen Bedeutung der Metabolisierung in den Lebermikrosomen auszugehen. Eine Beziehung zwischen Fremdstoffmetabolisierung und Zellwachstum bzw. Zellvermehrung war zudem auf Grund gesicherter experimenteller Daten durchaus denkbar.

Sowohl der mikrosomale Abbau der Stoffe als auch die Aktivierung der daran beteiligten Enzyme benötigen TPNH aus dem Cytoplasmaraum der Zelle. Auf Grund der zentralen Bedeutung des TPN-Systems für Biosynthesen erschien eine Wirkung auf Wachstums- und Vermehrungsvorgänge auf diesem Wege möglich. In der nach Teilhepatektomie oder chemischer Nekrotisierung regenerierenden Leber ist die Synthese von Zellbaustoffen gesetzmäßig mit Veränderungen der Redoxlage des TPN-Systems verbunden (KUNZ, 23).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob das durch Pharmaka induzierte Leberwachstum auf einer Beeinflussung TPN-abhängiger Mechanismen beruht. Hierzu mußten folgende, bisher nicht geklärte, Voraussetzungen gesichert werden: Es war zu prüfen,

1. ob durch den TPNH-Verbrauch der Metabolisierungsreaktionen der Umlauf des cytoplasmatischen TPN-Systems überhaupt erhöht wird,
2. ob eine eventuell stattfindende Umlauferhöhung ausreicht, dessen Redoxlage zu verändern,
3. ob durch eine mögliche Veränderung der Redoxlage Reaktionen des Wachstums- und Vermehrungsstoffwechsels beeinflußt werden.

B. Methodik

I. Tiermaterial und Applikationsweise

Wir verwendeten ausgewachsene männliche Albinomäuse aus der einheitlichen Zucht Z₂ der Bundesforschungsanstalt in Tübingen. Die Tiere wurden mit Futter der Firma Latz ernährt. Die Medikation erfolgte bei den Barbituraten Luminal und Evipan durch intraperitoneale Injektion. Die Applikation von Halothan erfolgte mittels eines Verdampfers der Firma Draeger (speziell geeicht für Halothan). Die Tiere wurden täglich eine Stunde bei einer Halothankonzentration von 1 % narkotisiert. Alle übrigen Pharmaka wurden dem Trinkwasser beigegeben.

II. Gewebeentnahme und Extraktion

1. Gewebeentnahme

Die gesamte Gewebeentnahme fand bei konstanter Temperatur von 0-3 Grad im Kühlraum statt. Die Tiere wurden dekapitiert, und nach gründlichem Entbluten wurde die gesamte Leber entnommen. Diese wurde sofort in flüssige Luft gebracht und nach vollständigem Durchfrieren nach einigen Sekunden auf der Torsionswaage zur Bestimmung des Gesamtgewichtes abgewogen. In einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten V₂A-Stanze preßten wir anschließend das Gewebe zu einer festen Tablette, die wir in drei etwa gleich große Stücke teilten, welche nach erneutem Wiegen zur Extraktion der Pyridinnukleotide weiterverarbeitet wurden.

2. Perchlorsäure-Extraktion zur Bestimmung von DPN, TPN und der freien Nucleotide

Etwa 400 mg Gewebe wurden mit 7,5 ml 3,3%iger Perchlorsäure im Kühlraum extrahiert. Nach gründlichem Homogenisieren mittels Magnetrührers zentrifugierten wir - wie auch bei den anderen Extraktionen - 20 Minuten bei 80 000 g in einer Kühlzentrifuge. 7 ml des klaren Überstandes wurden mit 0,3 ml K₂CO₃ (5M) unter Umrühren gepuffert und bis zum vollständigen

Ausfallen des Kaliumperchlorats in der Kälte stehengelassen. Anschließend wurden die enzymatischen Bestimmungen der oxydierten Pyridinnucleotide und einiger Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels durchgeführt.

3. Alkalische Extraktion zur Bestimmung von DPNH und TPNH

a) mit Natronlauge

5 ml n/10 NaOH wurden in einem "Potter"-Gefäß im Wasserbad auf 70 Grad C erhitzt, 500 mg Gewebe zugegeben und zwei Minuten homogenisiert. Die hierbei verdunstete Menge Wasser wurde ergänzt. Die Extrakte wurden anschließend sofort in Methanol abgekühlt und unter gleichzeitigem Homogenisieren durch Zugabe von 1 ml Citrat-Phosphat-Puffergemischs neutralisiert (pH 7-8).

Zusammensetzung des Puffergemischs:

Citratpuffer: 22 g Citronensäure p.a.

200 ml 1n NaOH

davon 180 ml + 20 ml 0,5 m PO_4 -Puffer

0,5 m Phosphatpuffer: 6 Teile 0,5 m Na_2HPO_4
4 Teile 0,5 m KH_2PO_4

b) mit alkoholischer Kalilauge

3 ml einer 0,5 n alkoholischen KOH-Lösung wurden im Wasserbad in einem "Potter"-Gefäß auf 70 Grad C erhitzt, das zugegebene Gewebe mit dem Stempel des Gefäßes zerkleinert und zwei Minuten extrahiert. Danach kühlten wir sofort auf Null Grad C und neutralisierten unter gleichzeitigem Homogenisieren durch Zugabe eines Puffergemisches aus 2 ml TRA- PO_4 -Puffer.

Zusammensetzung des Puffergemischs:

0,5 m Triäthanolaminhydrochlorid = 9,3 g

0,5 m KH_2PO_4 = 6,8 g

in 100 ml Aqua bidest. gelöst

III. Bestimmung der Pyridinnucleotidgehalte

Die Pyridinnucleotidgehalte wurden mit Hilfe der kombinierten enzymatischen Tests von HOLZER (17) ermittelt, wobei wir lediglich die Verfahren der Extraktion und Neutralisation modifizierten. Alle Bestimmungen wurden im Zeiss-Photometer PQM II bei 340 m μ durchgeführt. Die oxydierten Pyridinnucleotide bestimmten wir in Halbmikroküvetten von 2 cm Schichtdicke, die reduzierten Pyridinnucleotide in Mikroküvetten von 1 cm Schichtdicke.

1. Bestimmung von DPN und TPN

DPN und TPN lassen sich in einem Ansatz auf Grund folgender Fermentreaktionen bestimmen:

TPN + Glucose-6-phosphat Zwischenferment TPNH + Phosphoglukonat
beziehungsweise

DPN + Alkohol Alkoholdehydrogenase DPN + Acetaldehyd
Semicarbazid

Zusammensetzung des Testansatzes:

2 ml Perchlorsäureextrakt
0,2 ml TRA-Puffer 1m PH 7,6
0,1 ml Glucose-6-phosphat
0,01 ml MgCl₂ 10%

Start mit 0,02 ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase "Boehringer",
Laufzeit 10 Minuten, ΔE = TPN.

Danach Zugabe von 0,3 ml Semicarbazidalkohol (3,7 g Semicarbazid,
33 ml n/20 NaOH + 100 ml Alkohol)

Start mit 0,005 ml ADH "Boehringer", Laufzeit 3 Minuten,
 ΔE = DPN.

2. Bestimmung von DPNH und TPNH

DPNH und TPNH wurden in den von HOLZER angegebenen Alkaliextrakten und in KOH-Alkoholextrakten nach KLINGENBERG (22) ermittelt. Die Bestimmung erfolgte nach der kombinierten Methode HOLZERS mit Hilfe nachfolgender Enzymreaktionen:

a) Alkaliextraktion

DPNH + Dihydroxyacetonphosphat $\xrightarrow{\alpha\text{-GDH}}$ DPN + α -Glycerophosphat

b) KOH-Alkoholextraktion

DPNH + BTS $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Laktat + DPN

c) TPNH-Bestimmung

TPNH + Ketoglutarsäure + NH_4 $\xrightarrow{\text{GLDH}}$ TPN + Glutaminsäure

Zusammensetzung des Testansatzes:

2 ml Leberextrakt
0,2 ml TRA-Puffer 1m pH 7,6
0,05 ml Triosephosphatgemisch "Boehringer",
bzw. 0,1 ml BTS

Start bei a mit 0,02 ml GDH, bei b mit 0,01 ml LDH, Laufzeit 2 Minuten, Schichtdicke 1 cm, $-\Delta E = \text{DPNH}$
anschließend bei c) Zugabe von 0,1 ml α -Ketoglutarsäure,
Start mit Glutaminsäuredehydrogenase 0,05 ml, Laufzeit 3 Min.
 $\Delta E = \text{TPNH}$.

IV. Bestimmung der Pyridinnucleotide in Zellfraktionen

Die Bestimmungen wurden nach der Methode von JACOBSON und KAPLAN durchgeführt (19).

1. Zellfraktionierung

Annähernd 6 g Leber zweier entsprechender Tiere wurden mit der Schere zerkleinert und mit dem fünffachen Volumen einer 0,25 m Saccharoselösung mit 0,05 Nikotinsäureamidgehalt in einem Kugelhomogenisator nach DOUNCE (10) mit konstanter Zahl der Stempelpassagen homogenisiert. Die Stempel hatten einen Spielraum von 0,001 und 0,0005 inch an der Stelle des größten Kugelumfanges. Die Trennung der Zellfraktionen wurde nach den Angaben von SCHNEIDER (33) durchgeführt. Alle Arbeitsgänge

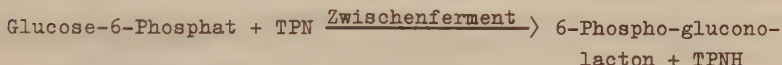
wurden im Kälteraum bei 0°C unter Verwendung vorgekühlter Gefäße, Pipetten und Lösungen durchgeführt.

2. Extraktion und Bestimmung der Pyridinnucleotide

Die Extraktion und die Bestimmung der Nucleotide aus den abzentrifugierten Fraktionen erfolgte wie bei den unter III. beschriebenen Gewebsanalysen.

V. Bestimmung von Glucose-6-Phosphat

Wir verwandten zur Bestimmung von Glucose-6-Phosphat die von HOHORST (16) angegebene Methode, die wir etwas modifizierten. Sie beruht auf folgender Reaktion:



Zusammensetzung des Testansatzes:

2,0 ml Leberextrakt
 0,2 ml TRA-Puffer pH 7,6 0,4 m
 0,1 ml TPN (10 mg/ml)
 0,02 ml MgCl_2 10%

Start mit 0,02 ml Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Laufzeit 10 Minuten, $\Delta E = \text{Glucose-6-Phosphat}$. Gemessen wurde in 2 cm Mikroküvetten bei 340 mp.

VI. Bestimmung der freien Nucleotide

Zur Bestimmung der Gesamtnucleotide wurden 0,1 ml des Perchlorsäureextraktes mit 1,9 ml Aqua dest. verdünnt und in Küvetten von 1 cm Schichtkörper bei 260 mp im "Zeiss"-Photometer gegen Wasser als Leerwert gemessen.

In der Fraktion der säureextrahierbaren freien Nucleotide werden summarisch Adenin-, Cytidin-, Pyridin-, Uridin-, Guanin- und Flavin-Nucleotide bestimmt. Die Absorptionsmaxima dieser Verbindungen liegen zwischen 250 und 270 mp. Obwohl die

Perchlorsäureextrakte zu etwa 70 Prozent aus Adeninnucleotiden bestehen, liefert die Extinktionsmessung bei 260 m μ keine exakt quantitativen Größen. Da es bei den Versuchen ohnehin ausschließlich darauf ankam, Veränderungen dieser Fraktionen vergleichend zu erfassen, begnügten wir uns mit der Berechnung von auf das Frischgewicht bezogenen Relativwerten, die sich aus den Extinktionsänderungen ergaben.

VII. Bestimmung der Nucleinsäuren

Der Niederschlag der Perchlorsäureextraktion wurde mit 10 ml Äther-Alkoholgemisch (1:3) entfettet, 20 Minuten bei 5000 U/Min. zentrifugiert und der Niederschlag mit 5 ml 6%iger Perchlorsäure homogenisiert. Nach Entnahme von 0,2 ml Homogenisats zur Proteinbestimmung wurden die Bestimmungen der Ribo- und Desoxyribonucleinsäuren durchgeführt. Hierzu verwandten wir die von W. MAYBAUM (26), DISCHE (9) bzw. RACKER (28) angegebenen Methoden.

Die Leberhomogenisate wurden 15 Minuten lang im kochenden Wasserbad hydrolysiert, im Kältebad abgekühlt und anschließend zentrifugiert. Den Überstand verwendeten wir zur weiteren Bestimmung.

1. Bestimmung der Gesamtnucleinsäuren, Orcin-Reaktion (MAYBAUM)

Es wurde ein Ansatz hergestellt, bestehend aus

0,1 ml Extrakt

1,9 ml Aqua dest.

2,0 ml Orcinreagens.

Dieser wurde genau 10 Minuten im kochenden Wasserbad belassen und dann im Kältebad abgekühlt. Die Bestimmung erfolgte im "Zeiss"-Photometer bei 660 m μ und in Küvetten von 1 cm Schichtdicke.

Zusammensetzung des Orcinreagens:

50 mg Orcin in 25 ml Stammlösung (= 70 mg CuCl₂ 2H₂O in 1000 ml HCl D_{1,19})

2. Diphenylaminreaktion (DISCHE) zur Bestimmung der DNS

1,0 ml Extrakt

2,0 ml Diphenylaminreagens

wurden 10 Minuten im kochenden Wasserbad belassen. Nach Abkühlen im Kältebad wurde die Extinktion im "Zeiss"-Photometer bei 600 m μ bestimmt (1 cm Schichtdicke).

Berechnung: Die Absolutwerte der Gesamtnucleinsäuren wurden mit Hilfe einer Eichkurve von Hefenucleinsäure bestimmt, DNS mit Eichkurven aus Desoxycytidin und Desoxyadenosin. Unter der Annahme, daß DNS je zur Hälfte aus Purin und Pyrimidinnucleotiden aufgebaut ist, wurden die Mittelwerte beider Eichkurven der Berechnung zugrunde gelegt.

VIII. Proteinbestimmung nach der Biuretmethode (WEICHSELBAUM, modifiziert nach BÜCHER) (3)

Die angegebene Methode wurde von uns dahingehend geändert, daß wir die Sedimente der zentrifugierten Leberhomogenisate mit 10 ml Äther-Alkohol (1:3) entfetteten, 20 Minuten bei 5000 U/Min. zentrifugierten, den Überstand abschütteten und den verbleibenden Niederschlag mit 5 ml 6%iger Perchlorsäure homogenisierten. Hiervon wurden

0,2 ml Extrakt mit

4,8 ml 0,1 n NaOH und

5,0 ml Biuretreagens

in ein Zentrifugenglas pipettiert. Der Ansatz wurde mit Hilfe von Magnetrührern gründlich durchmischt und etwa zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Anschließend zentrifugierten wir 10 Minuten bei 3000 U/Min. Als Blindwert lief parallel ein Ansatz, der

5,0 ml Biuretreagens und

5,0 ml 0,1 n NaOH enthielt.

Die Extinktion wurde am Photometer "Eppendorf" bei 2 cm Schichtdicke und bei 546 m μ gegen den Leerwert gemessen. Da im Ansatz gelegentlich eine Trübung auftrat, die zur Verfälschung der Ergebnisse führte, wurden im Anschluß an die Messung Ansatz

und Blindwert durch Zugabe von KCN entfärbt und nach Zentrifugieren erneut gegeneinander gemessen. Die nun auf Grund einer unspezifischen Trübung sich ergebende Extinktion wurde von der ursprünglichen Extinktion abgezogen.

IX. Bestimmung des O_2 -Verbrauches in der Warburg-Apparatur

Nach Tötung und Entbluten der Tiere wurde die Gesamtleber herauspräpariert und in Phosphat - Tyrodelösung gespült, der zur Hemmung der Nucleosidasen $n/100$ Nicotinamid zugesetzt war. Mit einer Rasierklinge wurden möglichst dünne Lebergewebsstreifen hergestellt. Die so erhaltenen Leberschnitte inkubierten wir 60 Minuten lang bei 37 Grad C in der "Warburg"-Apparatur. Nach der "direkten" Methode (Warburg) wurde dabei die Atmung kontinuierlich verfolgt. Als Nährlösung diente Phosphat-Tyrode, bestehend aus:

9 Teilen Tyrodelösung ($NaCl$ 0,8 %, $CaCl_2$ 0,02 %, KCl 0,02 %, $MgCl_2$ 0,01 %) und einem Teil $m/15$ Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, pH 7,4, dazu 0,3 % Glucose.

Die Ansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 2,0 ml. Der Gasraum enthielt bei der Messung des O_2 -Verbrauches reinen Sauerstoff. Bei Versuchsbeginn wurden die Gewebeschnitte möglichst gleichzeitig in die vorbereiteten und eisgekühlten Gefäße gebracht. Nach Einhängen in den Thermostaten durchströmten wir während des Temperatúrausgleiches 10 Minuten lang mit O_2 .

Bei Versuchsende wurde aus der Anhangsbirne der Warburggefäße 0,2 ml einer 50%igen Trichloressigsäurelösung eingekippt, so daß eine 5%ige Endkonzentration entstand. Das Gewebe zentrifugierten wir anschließend von der Inkubationsflüssigkeit ab und trockneten es bis zu Gewichtskonstanz. Alle Werte wurden auf die so erhaltenen Trockengewichte bezogen.

X. Bestimmung des oxydativen Glucose-6-PO₄-Shunts mit C₁ und C₆ markierter Glucose

1. Bestimmung der Dekarboxylierungsrate der Glucose

Den unter 7. beschriebenen Inkubationslösungen wurde differrent an C₁ bzw. an C₆ markierte C¹⁴-Glucose zugesetzt. Die spezifische Aktivität der einzelnen Ansätze betrug 1 μ C/2ml Nährlösung.

In die Innenzylinder der Warburg-Gefäße setzten wir kleine Glasgefäße mit 0,2 ml 2,5 n NaOH ein, in die wir zur Vergrößerung der Absorptionsfläche kleine Filterpapierstreifen einlegten. Das in Flüssigkeit und in Gewebe retinierte CO₂ wurde bei Versuchsende durch Einkippen der Trichloressigsäure ausgetrieben. Austreibung und Absorption der Rest-CO₂ waren nach fünf Minuten vollständig.

2. Bestimmung von C¹⁴O₂ nach der Bariumkarbonat-Methode

Die NaOH-Innenzylinder mit der absorbierten C₁₄O₂ wurden nach Versuchsende in Schliffgläser mit 5 ml Aqua dest. gegeben und einige Stunden bei Zimmertemperatur stengelassen. Während dieser Zeit wurde mehrmals kräftig umgeschüttelt. Die Aktivität wurde nach der Barium-karbonat-Methode bei konstanter Schichtdicke gemessen. Dazu wurde das gelöste CO₂ mit Bariumchlorid ausgefällt.

Herstellung der Bariumkarbonatfällung:

4 ml Extrakt

1 ml NaHCO₃ (2,1 g ad 100 ml)

2 ml BaCl₂NaH₄Cl (30,5 g Na₄Cl + 2 H₂O
+ 25 g NaH₄Cl ad 250 ml)

Das ausgefällt Bariumkarbonat wurde mit Hilfe einer Nutsche, unter mehrmaligem Nachspülen mit verdünnter NaOH, auf ein Rundfilterplättchen filtriert und bei 50 Grad im Wärmeschrank getrocknet. Die Aktivität wurde mit Geräten der Firma Nuclear, Chicago (Ultrascaler mit automatischem Probenwechsler und Zeitdrucker) über ein Gasdurchflußzählrohr (D-47 mit Fenster), Argon-Methan-Gemisch (Firma Liquid Air) gemessen.

XI. Statistische Berechnung

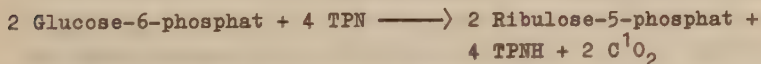
Um die Fehlerbreite beurteilen zu können, wurde die mittlere Abweichung der Einzelwerte σ_E und die mittlere Abweichung der Mittelwerte σ_m berechnet. Die statistische Signifikanz wurde auf Grund der t-Verteilung ermittelt. Als Sicherheitsgrenze legten wir $P < 0,0025$ fest.

C. Ergebnisse

I. Beeinflussung des extramitochondralen TPN-Umsatzes der Leberzelle durch die Metabolisierung von Fremdstoffen

Erste Voraussetzung einer kausalen Beziehung zwischen der Metabolisierung von Fremdstoffen und der Auslösung von Zellwachstumsvorgängen über TPN-abhängige Stoffwechselmechanismen ist, daß eine Belastung der Metabolisierungsenzyme überhaupt zu einer wesentlichen Umlauferhöhung des TPN-Systems führt. Das wurde von BRODIE und GILETTE auf Grund von Untersuchungen über den TPNH-Verbrauch des Methylaminoantipyrin-Abbaus verneint (14). Sie prüften den TPNH-Verbrauch an isolierten Mikrosomensystemen im Anschluß an Substratzugabe. Aus methodischen Gründen sind Untersuchungen in isolierten Systemen zur Entscheidung unserer Frage jedoch wenig geeignet, da durch verschiedene unspezifische TPNH-verbrauchende Reaktionen große Täuschungsmöglichkeiten gegeben sind. Außerdem muß nach NETTER hier mit einer Entkopplung des TPN-Oxydase-Systems gerechnet werden. Wir prüften deshalb diese Frage erneut mit der C_1 - C_6 Methode, die eine Untersuchung auch in der intakten Zelle zuläßt.

Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, daß der oxydative Glucose-6-phosphat-Abbau in der intakten Zelle durch die Bereitstellung von oxydiertem TPN limitiert wird. Eine Steigerung der cytoplasmatischen TPNH-Oxydation führt über die Regeneration von oxydiertem TPN zu einer quantitativ gleichen Erhöhung des Glucose-6-phosphat-shunts. Nach der Summengleichung dieser Reaktion



werden pro zwei Mol umgesetzten TPNH ein Mol CO_2 aus der C_1 -Stellung der Glucose abgespalten. Die C_1 -Dekarboxylierung ist deshalb ein stöchiometrisches Maß des TPN-Umsatzes. Um Unterschiede bei der Aufnahme von extrazellulärer Glucose zu berücksichtigen, die besonders durch unterschiedliche Glykogengehalte

bzw. durch verschiedene Stoffwechselaktivitäten bedingt sein können, wird gleichzeitig die C_6 -Decarboxylierung der Glucose bestimmt. Der in der Literatur allgemein angeführte Quotient

$\frac{C_1-C_6}{C_6}$ ist ein relatives Maß der Aktivität des Glucose-6-phosphat-shunts.

1. Der extramitochondriale TPN-Umsatz in der Leber unbehandelter Tiere

Um vergleichbare Kontrollwerte zu erhalten, prüften wir zunächst die C_1/C_6 -Relation bei unbehandelten Tieren unterschiedlichen Gewichts mit entsprechend unterschiedlicher Lebergröße. Es zeigte sich, daß das C_1/C_6 -Verhältnis bei ausgewachsenen Mäusen (20-30 g) sehr konstant ist. Unterschiedliche Werte fanden wir nur bei sehr jungen Tieren unter 18 g mit noch stark wachsenden Lebern. Hier waren die Werte deutlich erhöht. Wir verwendeten daher nur ausgewachsene, gleichgeschlechtliche Tierkollektive und erhielten folgende Werte (Größenangabe in cpm/q FG/St.):

	n	C_1	C_6	C_1-C_6	C_1/C_6	σE
Kontrolle	38	1755	741	1014	2,36	0,21

Tab.1. Decarboxylierung von C_1 - und C_6 -markierter Glucose durch Leberschnitte unbehandelter Mäuse (Größenangabe in cpm/g Frischgew./St.)

2. Die Beeinflussung des extramitochondralen TPN-Umsatzes der Leberzelle nach Applikation von Pharmaka in vitro

Wir prüfen nun, ob die Aktivität des Glucose-phosphat-zyklus durch den Abbau in vitro zugesetzter Pharmaka erhöht wird. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm der Abbildung 1 und in den Tabellen I-III dargestellt. Nach Zusatz von 150 γ /ml Evipan zeigte sich eine sichere Erhöhung des Quotienten auf durchschnittlich 200 % der Norm. Diese Erhöhung war nach Zusetzen entsprechender Dosen von Luminal bzw. Trapanal zwar weniger ausgeprägt, doch fanden wir bei beiden Pharmaka eine Zunahme

Beeinflussung der Glukose-6- PO_4 -Oxydation
in Leberschnitten durch Einwirkung von
Pharmaka in vitro.

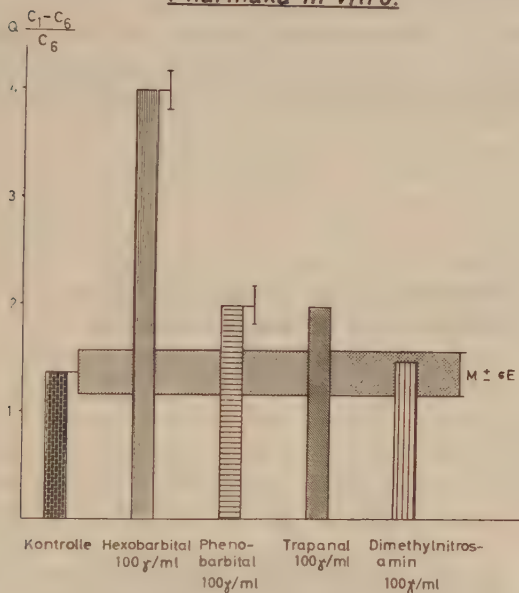


Abb. 1

des Quotienten um 25 %. Das sehr aktive, lebercarcinogen wirkende Dimethylnitrosamin, welches wir bei allen Versuchsreihen mituntersuchten, um Anhalte über die Bedeutung der biochemischen Veränderungen zu gewinnen, zeigte bei einer Konzentration von 120 μ /ml in vitro keine nennenswerte Erhöhung des C_1/C_6 -Quotienten (104 %). Die absoluten Größen - sowohl der C_1 - als auch der C_6 -Dekarboxylierung - waren jedoch um nahezu 100 % erhöht. Die Steigerung des Quotienten in vitro beruhte bei den anderen Stoffen ausschließlich auf der wesent-

lich erhöhten C_1 -Abspaltung, da die C_6 -Abspaltung nur in geringerem Maße zunahm (Tabellen I-III).

3. Die Beeinflussung des extramitochondralen TPN-Umsatzes der Leberzelle nach Applikation von Pharmaka in vivo

a) einmalige Applikation

Bei Applikation der Substanzen in vivo war der C_1/C_6 -Quotient qualitativ ähnlich verändert wie bei den Versuchen in vitro. Die Steigerung war verständlicherweise quantitativ wesentlich geringer.

Beeinflussung der Glucose-6- PO_4 -Oxydation durch einmalige Applikation von Pharmaka

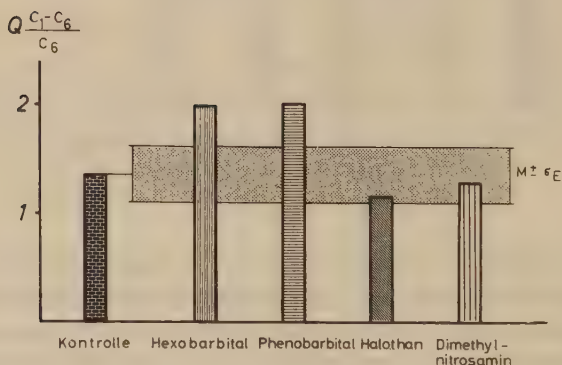


Abb. 2

Beeinflussung der C_1/C_6 -Relation durch einmalige Applikation von 100 mg/kg Hexobarbital, 100 mg/kg Phenobarbital, Dimethylnitrosan im Trinkwasser 10 mg/kg und Halothan 1% eine Stunde Inhalation.

Nach einmaliger Applikation von 100 mg/kg Evipan fanden wir die Quotienten nach 30 Minuten um 30% erhöht, die Wirkung ließ dann sehr rasch nach, und nach einigen Stunden lagen die Werte im Bereich der Norm. Die Steigerung der C_1/C_6 -Quotienten beruhte auf der Erhöhung der C_1 -Dekarboxylierung. Die Freisetzung von $C^{14}O_2$ aus der C_6 -Stellung der Glucose war gleichfalls jetzt weniger als die C_1 -Dekarboxylierung erhöht. (Tabelle II)

	Dosis	Zeit	n	C_1	C_6	C_1/C_6	C_1-C_6	C_1+C_6
Kontrolle			38	1755	741	2,36	1014	2496
Evipan	in vitro		12	4666	935	4,99	3731	5601
Evipan	1x in vivo	nach 1/2h	6	4151	1338	3,1	2813	5489
Evipan	1x in vivo	nach 3 h	6	3516	1803	1,95	1713	5319
Evipan	1x in vivo	nach 16 h	6	3841	1602	2,39	2239	5443

Tab. 2. Beeinflussung der Dekarboxylierung von C_1 - und C_6 -markierter Glucose durch Hexobarbital in vitro (100 mg/l) und in vivo (100 mg/kg i.p.)

Die Shuntaktivierung nach einmaliger Einwirkung von Luminal war bedeutend geringer. Sie lag im Bereich der in vitro gefundenen Werte (Tabelle III, Abb. 2). Einmalige Applikationen von Halothan und von Dimethylnitrosamin (Tabelle II, Abb. 2 und 3) waren ohne sichere Wirkung auf die Shuntaktivität.

b) chronische Applikation

Nach chronischer Einwirkung von 100 mg/kg i.p. Evipan erfolgte der Wirkungsabfall erheblich schneller. So wurden nach achttägiger Applikation bereits nach einer Stunde normale Werte für den C_1/C_6 -Quotienten gefunden. Allerdings waren die Absolutwerte der C_1 - und auch der C_6 -Abspaltung, wie schon bei der einmaligen Applikation, um über 100 % erhöht (Tab.II).

Bei chronischer Einwirkung von Luminal 100 mg/kg wurde ein völlig anderer Verlauf gefunden. Bereits nach zweimaliger Applikation stiegen die C_1/C_6 -Quotienten steil an und erreichten nach etwa vier Tagen Maximalwerte, die noch nach 24 Stunden 250 Prozent der Norm betrug (Abb. 3).

Beeinflussung der Glukose-6- PO_4 -Oxydation durch Einwirkung von Pharmaka in vivo.

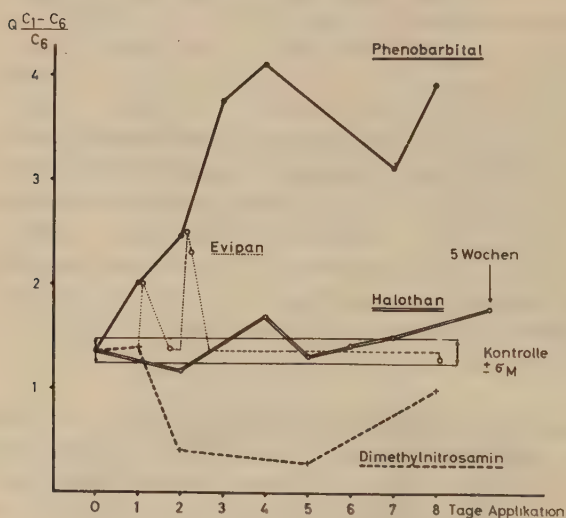


Abb. 3

Beeinflussung der C_1/C_6 -Relation während chronischer Zufuhr von 100 mg/kg Hexobarbital, 100 mg/kg Phenobarbital und 10 mg/kg Dimethylnitrosan p.o. sowie durch einstündige tägliche Narkose mit 1 % Halothan.

Während die beträchtliche Erhöhung der Quotienten bei einmaliger Applikation auf einer beinahe isolierten Steigerung der C_1 -Dekarboxylierung mit nur leicht vermehrter C_6 -Abspaltung beruht, wird die lang andauernde Erhöhung nach mehrtägiger Einwirkung durch eine gleichzeitige Senkung der C_6 -Abspaltung mitverursacht (Tabelle III).

Wie Phenobarbital verhielten sich zahlreiche andere Barbiturate, die bei chronischer Zufuhr Leberwachstum induzieren. Die Aktivierung des Pentose-phosphat-Shunts zeigte annähernd die gleiche Abstufung wie das Leberwachstum. Die im Wachstumsversuch unwirksamen Substanzen besaßen keinerlei Einfluß auf den Pentose-phosphat-Shunt. Einen Überblick über das Ausmaß der Umlauferhöhung des Horecker-Zyklus nach einwöchentlicher Applikation einiger Pharmaka gibt die folgende Tabelle.

Substanz	C_1	C_6	C_1/C_6	C_1-C_6
Eunarcon 200 mg/kg	100 %	99 %	106 %	103 %
Prominal 200 mg/kg	130 %	94 %	140 %	163 %
Phanodorm 200 mg/kg	133 %	104 %	135 %	160 %
Pentobarbital 200 mg/kg	107 %	90 %	124 %	123 %
DDT 32 mg/kg	171 %	135 %	128 %	203 %
Coramin 200 mg/kg	81 %	72 %	115 %	90 %

Tabelle 3: Beeinflussung der C_1 - und C_6 -Dekarboxylierung von Glucose durch chronische Einwirkung lebervergrößernder Pharmaka. Angaben der Größen in Prozent der unbehandelten Kontrollen.

Bei chronischer Inhalation von Halothan (1 %, 1 Stunde täglich) blieben die C_1/C_6 -Quotienten während der ersten Tage im Bereich der Norm (Abb.4, Tab. I). Die Werte der C_1 - und auch

der C_6 -Dekarboxylierung waren dabei unter Beibehaltung ihrer Relation absolut erniedrigt. Etwa nach siebentägiger Behandlung stiegen die Quotienten an und zeigten sich nach zwanzigtägiger Applikation und auch nach fünf Wochen wenig, jedoch konstant, erhöht. Dies beruhte im wesentlichen auf einer weiteren Einschränkung der C_6 -Werte.

Bei chronischer Einwirkung von Dimethylnitrosamin setzte sich die schon bei den in vitro-Versuchen gefundene Tendenz fort. Die C_1 -Abspaltung blieb während der ganzen Beobachtungszeit maximal erhöht. Die Absolutwerte der C_6 -Freisetzung stiegen hier kontinuierlich an und erreichten schon nach zwei Tagen Werte, die quantitativ über denen der erhöhten C_1 -Abspaltung lagen. (Abb.3, Tab.I). Die C_1/C_6 -Relationen waren infolgedessen erniedrigt. Nach drei Monaten kam es zu einer fast vollständigen Angleichung der Absolutwerte der C_1 - und der C_6 -Dekarboxylierung.

4. Beeinflussung des O_2 -Verbrauches der Leberzelle durch Einwirkung von Pharmaka

Von wesentlicher Bedeutung für die Beurteilung der Wirkung auf die Dekarboxylierungsgrößen war die Kenntnis des O_2 -Verbrauchs der untersuchten Gewebe. In den Ansätzen zur Ermittlung der Glukosedekarboxylierung wurden deshalb regelmäßig Messungen der Gewebsatmung durchgeführt.

a) Applikation in vitro

Bei in vitro-Zusatz war der O_2 -Verbrauch der Leberschnitte durch Evipan und Luminal gering, aber statistisch sicher erhöht. Dimethylnitrosamin führte ebenfalls zu einer signifikanten Atmungssteigerung (Tab.4, S.27).

b) Applikation in vivo

Bei Applikation in vivo führte Evipan (100 mg/kg) zu einer Steigerung des O_2 -Verbrauchs, die zeitlich der Steigerung der Glukosedekarboxylierung etwa parallel lief. Sie war nach 30 Min. um 40 % gesteigert und lag nach 40 Stunden wieder im Bereich der Norm. (Abb.4, Tabelle IV)

	n	Q O ₂	σM	P <	% Veränderung
Kontrolle	38	7,416	0,278	-	-
Evipan 100 mg/l	12	8,613	0,109	0,001	116 %
Luminal 100 mg/l	11	8,338	0,239	0,01	113 %
Dimethylnitrosamin 100 mg/l	6	8,638	0,215	0,001	116 %

Tabelle 4: Beeinflussung des O₂-Verbrauchs von Leberschnitten durch Zusatz von Pharmaka in vitro

Luminal (100 mg/kg) verhielt sich auch hier völlig verschieden. Der O₂-Verbrauch war bei einmaliger Applikation nach 24 Stunden noch gering erhöht, sank aber am zweiten Tag auf statistisch sicher erniedrigte Werte ab (Abb.4, Tab.V).

Beeinflussung des O₂-Verbrauches von Leberschnitten durch Einwirkung von Pharmaka in vivo.

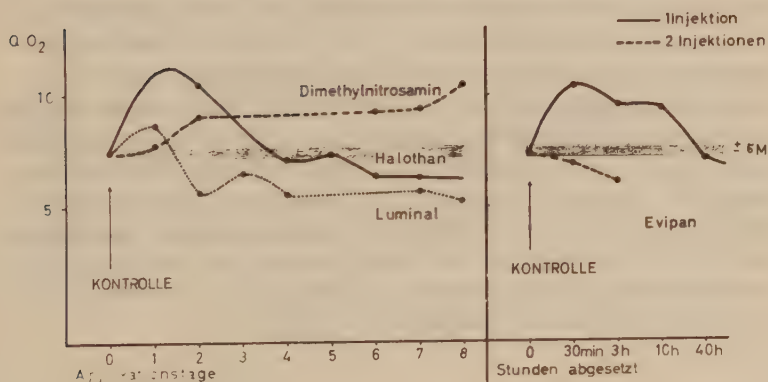


Abb. 4

Einen analogen Verlauf zeigten die Halothanversuche. Auch hier sanken nach einer initialen Steigerung die Atmungswerte kontinuierlich ab und betrugen nach sieben Tagen 85 %, nach fünf Wochen 76 % der Norm (Abb.4, Tab.V).

Bei Dimethylnitrosamin war der Verlauf der Atmungskurven entgegengesetzt. Hier stieg der O_2 -Verbrauch mit der Zeitdauer der Einwirkung beständig an und betrug nach sieben Tagen 141 % der Norm (Abb.4, Tab.V).

II. Beeinflussung der stationären TPN-Konzentrationen und der Redoxlage des TPN/TPNH-Systems durch die Metabolisierung von Pharmaka

Daß die Einwirkung von Fremdstoffen zu einer Erhöhung des cytoplasmatischen TPNH-Verbrauchs in der Leber führt, war durch die Resultate dieser Versuchsreihe gesichert. Die Steigerung der TPNH-Oxydation und die damit verbundene Beschleunigung des TPN-Umsatzes beruhte bei den in vitro oder nach akuter Anwendung in vivo wirksamen Pharmaka auf anderen Mechanismen als bei den erst nach chronischer Zufuhr effektiven Substanzen. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen werden. Für unsere Fragestellung war in beiden Fällen von Bedeutung, ob die Erhöhung des TPNH-Verbrauches durch die Steigerung der TPNH-regenerierenden Systeme, wie vor allem der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, kompensiert werden kann, oder ob es gleichzeitig zu einer Verschiebung des TPN-Redoxstatus innerhalb des Cytoplasmariums kommt. In der folgenden Versuchsreihe wurden deshalb die stationären TPN-TPNH-Gehalte während der Pharmakaeinwirkung analysiert. Um zu beurteilen, ob es sich bei einer eventuellen Änderung um eine isolierte Verschiebung des TPN-Systems oder um eine Beeinflussung der gesamten cytoplasmatischen Redoxsysteme handelt, wurden zum Vergleich auch die DPN/DPNH-Gehalte mitbestimmt.

1. Stationäre Pyridinnucleotidgehalte und Redoxlage des TPN-Systems in der Leber unbehandelter Tiere

Bei Prüfung der chronischen Pharmakaeinwirkung über längere Zeiträume war es notwendig, zunächst den Variationsbereich bei unbehandelten Tieren zu untersuchen. Wir fanden in der Leber im Gesamtkollektiv der Kontrolltiere folgende Gehalte:

n	DPN	DPNH	DPN+DPNH	DPN/DPNH	TPN	TPNH	TPN+TPNH	TPN/TPNH
107	763	227	990	3,80	108	299	404	0,37
SE	±112	± 17			± 3	±4,24		
SM	±22,7	±7,35			±4,24	±10,7		

Tabelle 5: Mittlere Pyridinnucleotidgehalte der Leber unbehandelter Mäuse (Größenangabe in $\mu\text{mol/g FG}$)

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß vor allem die TPN-Gesamtgehalte, besonders durch die Variation der TPNH-Werte, beträchtlichen Schwankungen unterliegen. Dies ist auch von anderen Untersuchern immer wieder beschrieben worden. Wesentliche Ursachen dieser physiologischen Schwankungen sind die Tages- und Jahreszeit der Untersuchung und das Alter der Tiere.

a) Abhängigkeit der Pyridinnucleotidgehalte und der Redoxlage vom Alter der Tiere

Um die gesetzmäßigen Beziehungen zwischen Pyridinnucleotidgehalt, ihrer Redoxrelation und dem altersabhängigen Tiergewicht zu erfassen, wurde aus einem Kollektiv unterschiedlich schwerer Mäuse für die Summe der Pyridinnucleotid-Gehalte und für die TPNH-Gesamtgehalte der Leber je eine Regressionsgerade aufgestellt. Den Regressionskoeffizienten berechneten wir nach der Formel

$$b = \frac{S(x_1 \cdot y_1) \cdot n - T_x \cdot T_y}{S(x_1)^2 \cdot n - T_x^2}$$

x_1, y_1 = Einzelwerte

T_x, T_y = Summe der Einzelwerte x_1 und y_1

$S(x_1 \cdot y_1)$ = Summe der Produkte aus den Einzelwerten

$S(x_1)^2$ = Summe der Quadrate der Einzelwerte
 n = Anzahl der Einzelwerte x_1 und y_1 .

Es zeigte sich, daß eine lineare Beziehung besteht (Abb.5). Daher schien es uns berechtigt, die entsprechenden Gesamtgehalte in der Leber verschieden schwerer Tiere auf ein "Standardtier" von 25 Gramm umzurechnen. Der Anstiegswinkel der einzelnen Regressionsgeraden war verschieden. Die Diphosphorpyridinnucleotidgehalte nehmen bei wachsendem Lebergewicht in stärkerem Maße zu als die der Triphosphorpyridinnucleotide. Ebenso verhält sich der Anstieg der freien Nucleotide, deren Konzentration im Laufe des physiologischen Leberwachstums ebenfalls kontinuierlich zunimmt. Das kann vielleicht als Äquivalent der Zunahme des Plasmaraumes im Laufe des Organwachstums betrachtet werden. Wesentliche Unterschiede der Redoxlage des TPN-Systems beobachteten wir nur bei sehr jungen Tieren mit Gewichten unter 18 Gramm. Als Kontrolltiere verwendeten wir daher nur Mäuse von über 22 Gramm Gewicht.

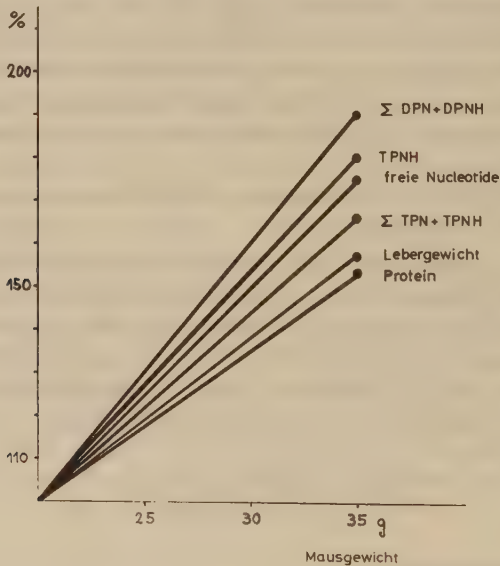


Abb. 5. Altersabhängigkeit von Pyridinnucleotiden, freien Nucleotiden, Gesamtprotein und Lebergewicht in der Leber der weißen Maus

b. Tages- und jahresperiodische Schwankungen der
Pyridinnucleotidgehalte in der Mäuseleber

Von erheblicher experimenteller Bedeutung erwiesen sich die auch von anderen Stoffwechselgrößen bekannten rhythmischen Schwankungen sowohl der Nucleotidgehalte als auch der Redoxlage. Bei Analysen zu verschiedenen Tageszeiten wurden häufig gleichsinnige Unterschiede in den Ergebnissen gefunden. Besonders schienen die TPNH-Gehalte bei den am frühen Morgen untersuchten Tieren höher als bei den am Nachmittag geprüften Tieren zu liegen. Eine statistische Signifikanz war allerdings nicht zu errechnen. Um jedoch Fehlermöglichkeiten auszuschalten, führten wir unsere Untersuchungen immer zur gleichen Tageszeit durch. Sicher nachzuweisen waren jahresperiodische Schwankungen. In Übereinstimmung mit früheren Versuchen stiegen die TPN+TPNH-Gesamtgehalte im Herbst an, erreichten im Dezember und Januar Maximalwerte, fielen dann wieder ab und waren im Sommer bis zur Hälfte erniedrigt (Abb. 6). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Untersuchung von GLOCK und MC LEAN (15), die bei der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase analog verlaufende Aktivitätsunterschiede fanden.

Auf Grund dieser periodischen Schwankungen erwies es sich als notwendig, bei länger dauernden Versuchen laufend Kontrollgruppen mitzuprüfen und Veränderungen auf die im gleichen Zeitbereich untersuchten Vergleichskollektive zu beziehen.

Jahresperiodische Schwankungen der Pyridin=
nukleotide der Mäuseleber

[Streubereich = $\pm \sigma_m$]

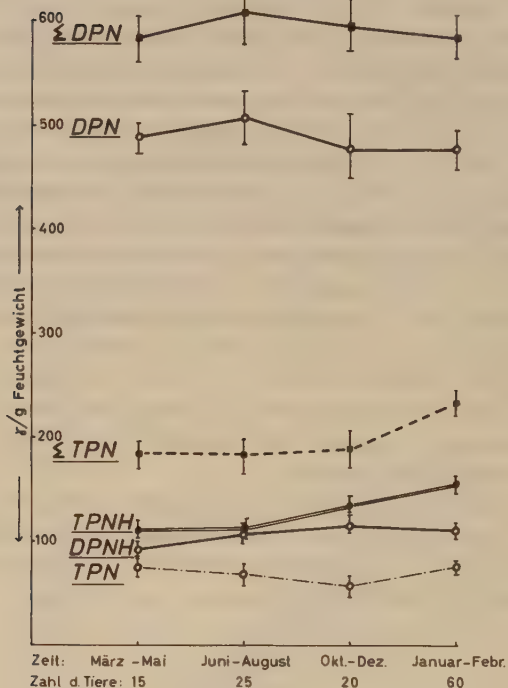


Abb. 6

2. Beeinflussung des TPN-Systems durch einmalige Applikation
von Pharmaka

Durch einmalige Applikation von Fremdstoffen sollte vor allem geprüft werden, ob die eigentliche Stoffmetabolisierung, die ja, wie wir bei den C_1/C_6 -Untersuchungen nachweisen konnten, in der Lage ist, den TPN-Umlauf zu erhöhen, auch zu einer Beeinflussung der Redoxlage des TPN-Systems führt.

Es zeigt sich, daß das Redoxgleichgewicht durch einmalige, kurzdauernde Belastung der Abbaureaktionen nicht geändert wird. Selbst bei Einwirkung höchster Dosen des schnell metabolisierten Hexobarbital blieben TPNH-Gehalt und Redoxlage im Bereich der Norm. Die Abbildung 7 zeigt die TPN-TPNH-Gehalte der Leber eine Stunde nach Applikation einiger Pharmaka.

Beeinflussung der TPN-TPNH-Gehalte der Leber durch Pharmaka

Bestimmung 1 Stunde nach Applikation.

Gehaltsangaben in $\mu\text{Mol/g}$ Frischgewicht.



Abb. 7

Um eine maximale Belastung der Metabolisierungssysteme der Leber zu erreichen, applizierten wir einige Stoffe mit geringerer Gesamtoxizität, von denen daher höhere Dosen verabreicht werden konnten: 3 g/kg Chloramphenicol, 5 g/kg des un-toxischen Azofarbstoffes Zeres-Rot, bzw. 5 g/kg Methylorange. Bei keinem dieser Stoffe konnten wir eine Abnahme der TPNH-Gehalte feststellen. Die TPNH-regenerierenden Systeme der Leber sind also offenbar befähigt, kurzdauernde maximale Beanspruchungen voll zu kompensieren.

Lediglich Luminal, das sehr langsam ausgeschieden wird,

führte nach Applikation von 0,1 g/kg schon nach 24 Stunden zu einer signifikanten Erniedrigung der TPNH-Werte und zu einer Verschiebung des Redoxverhältnisses TPN/TPNH zugunsten des oxydierten TPN (Tabelle X).

3. Beeinflussung des TPN-Systems durch chronische Einwirkung von Pharmaka

Die bei den akuten Versuchen schon angedeuteten Unterschiede in der Wirkung verschiedener Fremdstoffe wurden deutlich bei chronischer Applikation.

Das schnell abgebaute Hexobarbital führte auch bei Dauerszufuhr maximal tolerierter Dosen (150 mg/kg) zu keiner Veränderung der Gesamtgehalte und zu keiner signifikant nachweisbaren Redoxverschiebung. Das gleiche gilt für die anderen schnell abgebauten Fremdstoffe wie Chloramphenicol (1 g/kg) und nicht cancerogene Azoderivate, die alle einen hohen Substratumsatz besitzen und das Mikrosomensystem daher stark belasten.

Phenobarbital hingegen hatte nach mehrmaliger Applikation von 100 mg/kg eine deutliche Wirkung auf das TPN-System. Die TPN-TPNH-Konzentrationen der Leber sanken etwa vom zweiten Tage an kontinuierlich ab (Tab. X und XI). Diese Konzentrationsverminderung beruhte jedoch nicht auf einem verstärkten Abbau, sondern auf dem Fehlen einer der Lebervergrößerung parallel laufenden Synthese. Bezogen auf die Gesamtleber blieben die Gehalte der Summen TPN+TPNH unverändert (Abb.8, Tab.XII). Während der Phase der Konzentrationsabnahme kam es zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses TPN/TPNH zugunsten der oxydierten Form. Das war vor allem durch die zunehmend starke Erniedrigung der TPNH-Werte bedingt, die schon vom ersten Tag der Phenobarbitalapplikation an absanken und bis zum zehnten Tag konstant erniedrigt blieben. Die TPN-Gehalte stiegen nach vorübergehendem Abfall umgekehrt kontinuierlich an und erreichten bereits am dritten Applikationstag wieder die Normalwerte. Der Redoxquotient TPN/TPNH stieg aus diesem Grund gleichmäßig an und erreichte mit 48 Prozent Erhöhung etwa am 10. Tag ein Maximum.

Die Veränderungen des DPN-Systems waren im Hinblick auf die

Gesamtgehalte ähnlich. Auch hier sanken die Konzentrationen durch Fehlen der Synthese kontinuierlich ab, die Gesamtgehalte, bezogen auf die ganze Leber, blieben unverändert. Ähnlich ausgeprägte Verschiebungen des Redoxstatus wie bei dem TPN-System konnten hier jedoch nicht gefunden werden. Die DPN- und DPNH-Gehalte erreichten etwa am 7. Applikationstag wieder die Norm.

Die Pyridinnucleotidveränderungen betreffen also in erster Linie das TPN-System. Ähnlich ausgeprägt wie Phenobarbital wirkte Prominal. Die übrigen untersuchten Barbiturate waren weniger wirksam. Unwirksam waren auch hier die vergleichsweise mitgeprüften, mikrosomeninduzierenden zyklischen Kohlenwasserstoffe Benzpyren und Methylcholanthren. Nikethamid nahm wie bei der Beeinflussung des Leberwachstums und des Pentose-phosphat-Shunts (siehe Tab.6) eine Sonderstellung ein. Die TPNH-Gehalte sanken hier an den ersten Applikationstagen sehr stark ab, stiegen jedoch frühzeitig wieder an und lagen nach etwa einer Woche wieder im Normbereich.

*Beeinflussung der TPN-TPNH-Gehalte der Leber durch chronische
Pharmakaeinwirkung.*

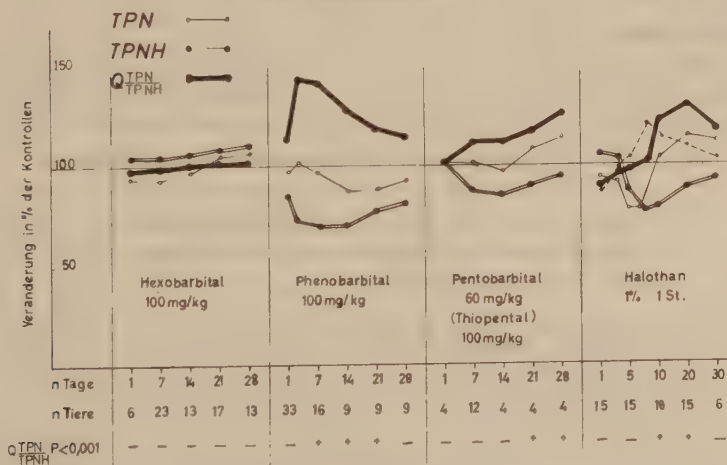


Abb. 8

Substanz	mg/kg	Zeit	n	TPNH = % mp Mol/g		TPN/TPNH = %	
Kontrollen	---	---	56	238	100	0,40	100
Phenobarbital	200 p.o.	1 Woche	16	183	-24	0,64	+60
Phenobarbital	200 p.o.	2 Wochen	16	164	-31	0,77	+92
Prominal	200 p.o.	1 Woche	8	188	-21	0,70	+75
Eunarcon	200 p.o.	1 Woche	8	204	-15	0,55	+38
Zyklobarbital	200 p.o.	1 Woche	4	208	-12	0,50	+25
Pentobarbital	200 p.o.	1 Woche	8	194	-18	0,56	+40
Hexobarbital	150 p.o.	1 Woche	8	224	- 6	0,43	+ 8
Barbitursäure	200 p.o.	1 Woche	8	232	- 3	0,41	+ 2
Glutethimid	200 p.o.	1 Woche	4	217	- 9	0,42	+ 5
Nikethamid	200 p.o.	1 Woche	4	166	-30	0,75	+87
Nikethamid	200 p.o.	2 Wochen	4	228	- 4	0,42	+ 5
Hexachlorzy- klohexan	34 p.o.	1 Woche	16	203	-14	0,50	+25
Benzpyren	34 p.o.	1 Woche	4	234	- 2	0,41	+ 2
Methyl- cholanthren	34 p.o.	1 Woche	4	229	- 4	0,42	+ 5
Mephensytoin	200 p.o.	1 Woche	4	208	-13	0,64	+60
Chlorphenotan	50 p.o.	1 Woche	8	190	-21	0,68	+70

Tabelle 6. Beeinflussung von TPNH-Gehalten und TPN/TPNH-Quotienten durch chronische Applikation verschiedener Pharmaka (Größenangabe der TPNH-Gehalte in mp Mol pro g Frischgewicht, Angabe der Veränderung in % der Normalwerte)

Unterschiedlich von der Phenobarbitalwirkung blieben bei chronischer Halothan einwirkung (1%, einstündliche Inhalation tgl.) die Gewebskonzentrationen beider Pyridinnucleotid-Systeme nahezu unverändert. Es werden demnach hier die Pyridin-nucleotide der Proteinzunahme annähernd parallellaufend mitsyn-thetisiert (Abb.9). Die Redoxrelation TPN/TPNH zeigte dabei

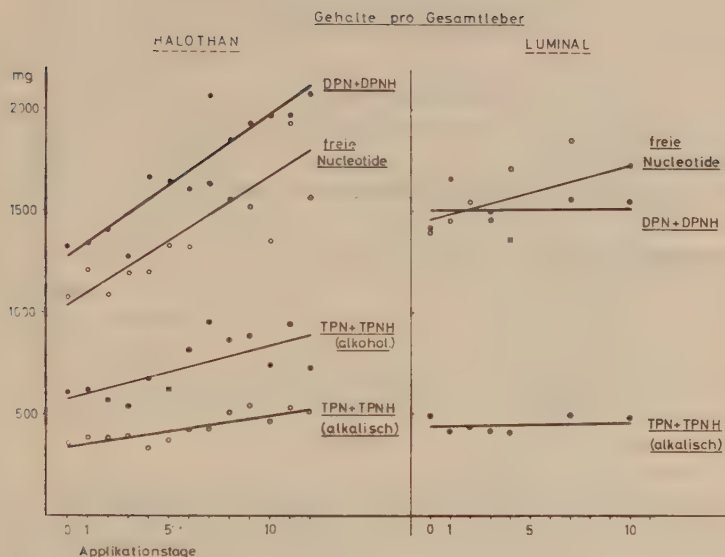


Abb. 9

Pyridinnucleotid-Gesamtgehalte und freie Nucleotide bei chron. Applikation von 100 mg/kg Phenobarbital und von Halothan (1%, 1 h tägl.). Größenangabe: Pyridinnucleotide in μg pro Gesamtleber, freie Nucleotide $\mu\text{g} \times 4$

einen deutlich biphasischen Verlauf. Bis etwa zum vierten Behandlungstag fanden wir in drei unabhängig voneinander untersuchten Serien eine Erhöhung der TPNH-Gehalte. Bei fort-dauern der Einwirkung sanken diese dann kontinuierlich ab und blieben innerhalb eines relativ großen Schwankungsbereiches während des Beobachtungszeitraums von 3 Wochen erniedrigt. Die TPN-Gehalte verhielten sich gegenläufig. Sie sanken zunächst ab und waren am vierten Applikationstag mit 63 % d.N. statistisch signifikant erniedrigt. Es erfolgte dann eine beständige Zunahme, und etwa vom neunten Tage an bewegten sich die TPN-Werte

im Normbereich (Tab. XV u. XVI). Daraus resultierte ein kontinuierlicher Anstieg der Redoxrelation. Sie zeigte auch nach drei Wochen noch eine ansteigende Tendenz (Abb. 18).

Die deutliche Verschiebung des TPN/TPNH-Quotienten schon am Ende der ersten Behandlungswoche war deshalb überraschend, weil wir zu diesem Zeitpunkt noch keine wesentliche Änderung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes gefunden hatten. Die TPNH-Verminde rung konnte danach hier nicht mit einer un kompensierten Steigerung des cytoplasmatischen TPNH-Verbrauchs erklärt werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten zu diesem Zeitpunkt in der Leber von Halothan-behandelten Tieren eine starke Vermehrung der Mitochondrien, die außerdem auch morphologisch verändert erschienen. Sie wiesen einen außerordentlich vergrößerten Matrixraum auf. Das ließ daran denken, daß die Verschiebung der TPN/TPNH-Gehalte hier auf einer veränderten Compartmentierung des TPN-Systems beruhen könne.

Für diese Annahme sprach die experimentelle Beobachtung, daß sich eine sichere Erniedrigung der TPNH-Gehalte nur bei Extraktion mit wäßrigem Alkali (nach HOLZER et al.) nachweisen ließ, daß aber bei der Extraktion mit alkoholischer KOH nach KLINGENBERG die Gesamtgehalte in den frühen Stadien der Halothaneinwirkung nur gering verändert waren. Hier fanden wir erst nach längerdauernder Einwirkung erniedrigte TPNH-Werte. Es findet also in dieser Phase eine Verschiebung von der alkalisch extrahierten TPNH-Fraktion zu der nur durch alkohol. KOH extrahierten Fraktion statt (Abb. 10).

Die durch die Extraktion mit alkohol. KOH zusätzlich gewonnene TPNH-Fraktion umfaßt überwiegend an Strukturen, vor allem mitochondrial gebundene Nukleotide. Die aus diesen Befunden zu folgende Annahme einer veränderten Compartmentierung des TPN-Systems durch Halothaneinwirkung, versuchten wir durch die Analyse der Nukleotidgehalte der einzelnen Zellräume zu sichern. Die Resultate bringt nachfolgende Tabelle (Tabelle 7). Sie zeigt, daß nach Halothanbehandlung in der Leber die stärksten Veränderungen des TPNH-Gehalts in den Mitochondrien gefunden werden. Hier scheint demnach der primär TPNH-verbrauchende Mechanismus lokalisiert zu sein. Eine veränderte Compartmentie-

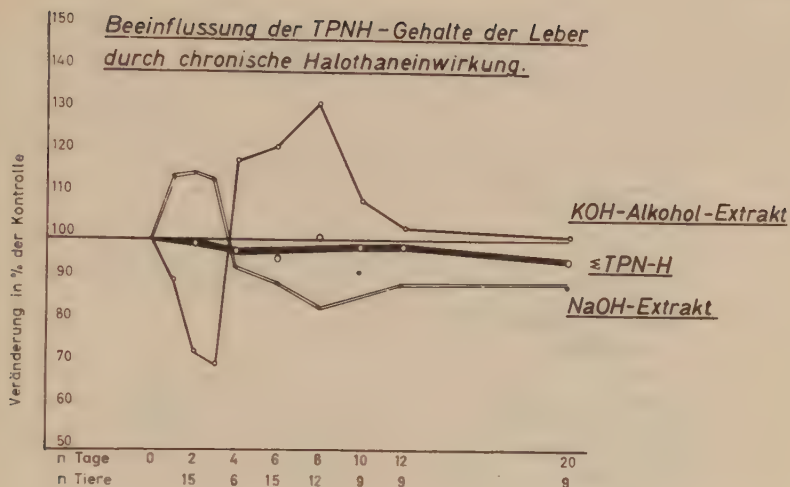


Abb. 10

Beeinflussung der Alkali-extrahierbaren und der durch alkohol. KOH extrahierbaren TPNH-Gehalte der Leber durch chronische Applikation von Halothan (1 %, 1 Stunde tägl.)
Doppellinie: prozentuale Veränderung der mit 1/10 n NaOH extrahierten TPNH-Gehalte, dicke Linie: mit alkohol. KOH extrahierte TPNH-Gesamtgehalte, dünne Linie: prozentuale Veränderung der zusätzlich durch alkoholische KOH extrahierbaren TPNH-Fraktion

Die Veränderung des gesamten TPN-Systems war zum Zeitpunkt der Untersuchung am 8. Tag bei Umrechnung der Größen auf die Gesamtgehalte pro g Leber nicht nachzuweisen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß durch die deutliche Zunahme der Pyridinnucleotid-Gesamtgehalte - die nach Halothaninhalation zu beobachten ist (Abb. 9, Tab. VI-IX) - zu diesem Zeitpunkt eine in den ersten Tagen auftretende Verschiebung innerhalb der Zellcompartimente wieder ausgeglichen ist.

Das DPN-System zeigte hinsichtlich der Redoxlage ein ähnliches Verhalten wie das TPN-System. Besonders die nach KOH-Alkohol-Extraktion gewonnenen DPNH-Werte fanden wir deutlich erhöht. Einzelheiten sind aus Tabelle XVII und XVIII zu entnehmen.

FRAKTION	n	TPN	TPNH	Σ TPN	$\frac{\text{TPN}}{\text{TPNH}}$	Σ DPN
<u>HOMOGENAT</u>						
Kontrolle	6	860	1440	2100	0,44	8640
Halothan	6	740	930	1670	0,77	5110
% Veränderung		+ 12 %	- 34 %	- 20 %	+ 77 %	- 23 %
P < 0,001			*		*	
<u>MITOCHONDRIEN</u>						
Kontrolle	6	1444	3851	5295	0,39	8222
Halothan	6	678	1250	1928	0,64	6214
% Veränderung		- 53 %	- 68 %	- 64 %	+ 64 %	- 22 %
P < 0,001		*	*	*	*	
<u>CYTOPLASMA</u>						
Kontrolle	6	471	1000	1471	0,48	4867
Halothan	6	940	560	1500	1,72	5360
% Veränderung		+100 %	- 44 %	+ 1 %	+167 %	+10 %
P < 0,001		*	*			*

Veränderungen der mitochondrialen und cytoplasmatischen TPN - TPNH - Konzentrationen (n Mol/g Protein) der Mauseleber durch Halothan (0,5 % Halothan - O₂ - Gemisch 7 x tgl 1 Std)

Tabelle 7

Nach siebentägiger Applikation von Dimethylnitrosamin fanden wir die Werte des reduzierten TPNH aus beiden Extraktionen erniedrigt, während die Konzentration des oxydierten TPN annähernd unverändert blieb. Hieraus ergab sich in unserer Beobachtungszeit eine konstante Verschiebung des TPN/TPNH-Verhältnisses zugunsten des TPN. Das Redoxverhältnis des DPN-Systems zeigte keine wesentliche Verschiebung. Die Gesamtgehalte sowohl des TPN- als auch des DPN-Systems nahmen beständig ab (Abb. 11, Tab. XXIII-XXVI).

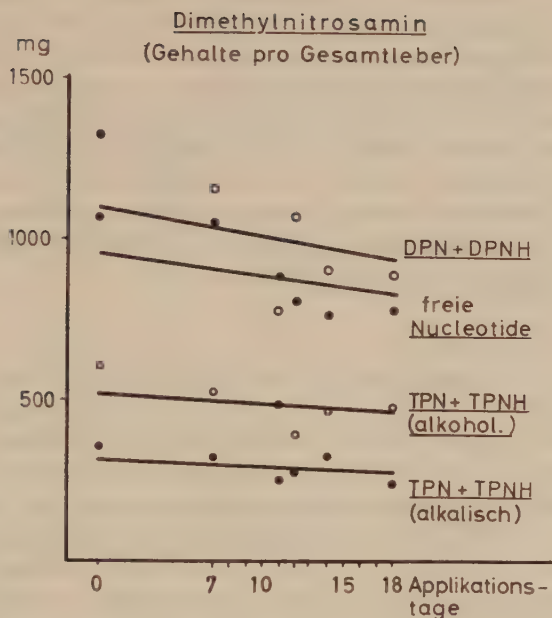


Abb. 11

Beeinflussung der Pyridinnucleotidgehalte und der freien Nucleotide durch chronische Zufuhr von Dimethylnitrosamin (10 mg/kg p.o.). Größenordnung wie in Abb. 9.

4. Beeinflussung der Glucose-6-phosphat-Gehalte der Leber durch die Applikation von Pharmaka

Nach BÜCHER und KLINGENBERG (4) gibt die Relation von oxydierten und reduzierten Nucleotiden bei der Normalzelle annähernd die reale Redoxlage des TPN-Systems wieder. Es ist nicht sicher, ob dies auch für die Verhältnisse der von uns untersuchten Lebern gilt, bei denen die Bindungsorte und möglicherweise auch die Bindungsverhältnisse für TPN und TPNH durch Neubildung von Enzymen oder Zellstrukturen wesentliche Veränderungen erfahren (KUNZ et al. 1966/24). Für das DPN-System

kann die reale Redoxlage aus den Metabolitspiegeln DPN-abhängiger Reaktionen beurteilt werden. Exakte Rückschlüsse auf die Redoxlage des TPN-Systems sind durch die Analyse von Substratpaaren nicht möglich. Erfahrungsgemäß geben jedoch die Glucose-6-phosphat-Gehalte bzw. die Glucose-6-phosphat/Fructosediphosphat Relationen gewisse Hinweise. Wir haben deshalb bei mit Phenobarbital, Halothan und Dimethylnitrosamin behandelten Tieren den Verlauf der Glucose-6-phosphat-Gehalte der Leber analysiert. Die Verläufe sind aus Abb. 12, 13 und den Tabellen XIII, XIV, IX-XXII, XXVII, XXVIII zu ersehen.

a. Luminal

Die Glucose-6-phosphat-Gehalte der Mäuseleber nach Luminalbehandlung standen im Einklang mit den bei der C_6/C_6 -Methode in der Warburg-Apparatur gefundenen Ergebnissen. 24 Stunden nach der ersten Applikation fanden wir signifikant erniedrigte Werte. Dies fällt zusammen mit der vorher beschriebenen initialen Steigerung sowohl der C_1 - als auch der C_6 -Abspaltung, die einen vermehrten Verbrauch von Glucose-6-phosphat bedingt. Vom vierten Beobachtungstag an bis zum Ende unserer Beobachtungszeit nahmen die Gehalte kontinuierlich ab, analog der Umsatzerhöhung des TPN-Systems (Abb. 3, Tab. III u. XIV).

b. Halothan

Von besonderem Interesse waren diese Analysen bei den mit Halothan behandelten Tieren, da sich hier zwischen Shuntaktivierung und Redoxverschiebung des TPN-Systems eine Diskrepanz nachweisen ließ. Der Verlauf ist in Abb. 12 dargestellt. Die Darstellung zeigt eine sehr exakte Korrelation zwischen Glucose-6-phosphat-Gehalten und den Veränderungen des TPN-Redoxverhältnisses. Während der ersten Behandlungstage, an denen wir erhöhte TPNH-Werte fanden, waren auch die Glucose-6-phosphat-Gehalte erhöht. Der Verschiebung des Quotienten $TPN/TPNH$ reziprok, sinken dann die Glucose-6-phosphat-Gehalte auf signifikant erniedrigte Werte ab (Tab. XXI u. XXII). Nach diesen Daten muß in Übereinstimmung mit den Analysen der einzelnen

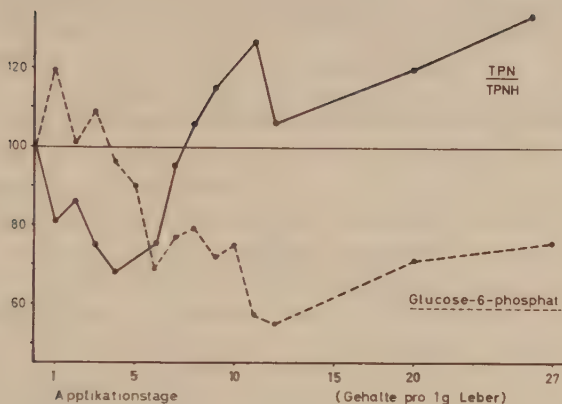


Abb. 12

Änderung des RPN/TPNH-Redoxquotienten und der Glucose-6-phosphat-Gehalte bei chronischer Halothaneinwirkung

Zellfraktionen eine Verschiebung der TPN-Redoxlage auch im Cytoplasmaraum angenommen werden.

c. Dimethylnitrosamin

Unter Einwirkung von Dimethylnitrosamin war, wie beschrieben, der Abbau von Glucose-6-phosphat erheblich beschleunigt, was sich bei der C_1/C_6 -Methode durch vermehrt entstehendes $C^{14}O_2$ ausdrückte. Die Gehaltsanalysen ergaben jedoch überraschend wesentlich erhöhte Glucose-6-phosphat-Konzentrationen in der Leberzelle. Dieser sich scheinbar widersprechende Befund könnte vielleicht seine Erklärung durch die von FREKSA u. Mitarbeitern mitgeteilte Beobachtung finden (13), daß nach chronischer Applikation von Dimethylnitrosamin ein maximales Absinken der Gehalte an Glucose-6-phosphatase auftritt. Die Leberzelle verliert dementsprechend die Fähigkeit, Glucose-6-Phosphat in Glucose umzuwandeln. Wegen der hohen Aktivität dieses Enzyms ist es denkbar, daß trotz erhöhter Glucose-6-

phosphat-Oxydation die Gehalte in der Leberzelle bei Ausfall der Glucose-6-phosphatase ansteigen (Abb. 13, Tab. XXVII).

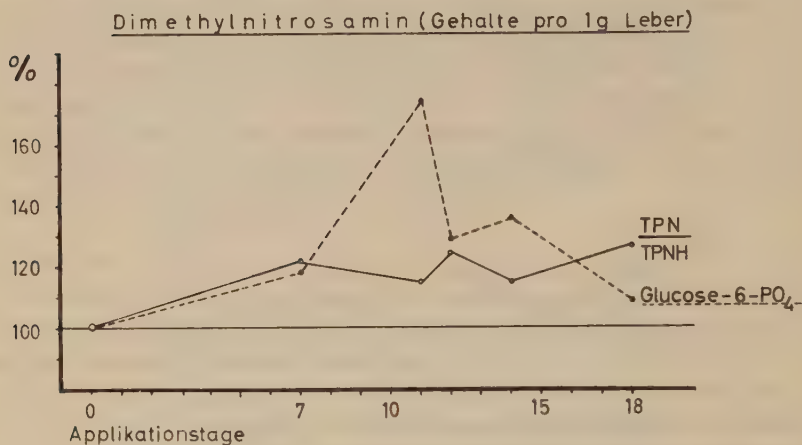


Abb. 13

Änderung des RPN/TPNH-Redoxquotienten und der Glucose-6-phosphatgehalte bei chronischer Einwirkung von Dimethylnitrosamin (10 mg/kg p.o. tägl.)

III. Der zeitliche Zusammenhang zwischen der Veränderung des extramitochondrialen TPN-Systems und der Synthese von freien Nucleotiden, Nucleinsäuren und Protein in durch Pharmakaeinfluß wachsenden Mäuselebern

Die bisher durchgeführten Untersuchungen hatten gezeigt, daß es bei chronischer Einwirkung lebervergrößernder Pharmaka zu einer Steigerung des cytoplasmatischen TPNH-Verbrauchs kommt, die trotz erheblicher Beschleunigung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes nicht kompensiert wird und daher zu einer Positivierung der Redoxlage des TPN-Systems führt. Bei unterschiedlich stark wirksamen Substanzen und bei Anwendung ver-

schiedener Dosen des gleichen Derivats, konnten sichere quantitative Übereinstimmungen zwischen dem Ausmaß der Lebervergrößerung und der Wirkung auf das TPN-System nachgewiesen werden. Das Bestehen eines Kausalzusammenhangs war damit sicher anzunehmen. Eine Aussage über den primären Vorgang ließen diese Resultate jedoch nicht zu. Es war nicht zu entscheiden, ob die erhebliche Steigerung des TPNH-Verbrauchs durch die Fremdstoffmetabolisierung über Reaktionen des Nucleotid- und Nucleinsäurerestoffwechsels (HOLZER und WITT, SCHMIED, CANELLACIS, SCHÖNBERGER, HIATT u.a.) Zellwachstum induziert, oder ob die Veränderungen des TPN-Systems erst sekundär als Folge des durch andere Mechanismen induzierten Wachstums auftreten. Eine sehr große Zahl von Biosynthesen der wesentlichen Zellbausteine benötigen TPNH-Wasserstoff (BÜCHER und KLINGENBERG). Die folgende Versuchsreihe sollte durch die Analyse der zeitlichen Zusammenhänge zwischen Veränderung der TPN-Redoxlage und dem Einsetzen zellulärer Biosynthesen Hinweise für die Beantwortung dieser Frage erbringen. Wir bestimmten als Summengrößen der wesentlichen Synthesen die Zunahme der Gesamtgehalte von freien Nucleotiden, RNS, DNS und Protein. Diese Untersuchungen wurden mit wenigen, die einzelnen Wirkungsgruppen charakterisierenden Substanzen durchgeführt. Als Vertreter der mikrosomeninduzierenden Barbitale untersuchten wir das stark wirksame Phenobarbital, als Beispiel der Halogenkohlenwasserstoffe Haloethan und als Beispiel eines Lebercarcinogens Dimethylnitrosamin.

1. Luminal

Schon nach einmaliger Applikation von 100 mg/kg Luminal fanden wir das Gesamtlebergewicht der Tiere erhöht; es stieg im weiteren Verlauf der Behandlung an und erreichte nach 1-2 Wochen ein Maximum (Tab.XII). Das relative Lebergewicht, ausgedrückt durch den Quotienten Lebergewicht/Körpergewicht, stieg entsprechend kontinuierlich an (Abb.14, Tab.XII). Daß es sich bei der Gewichtszunahme der Leber nicht um hydropische Schwellung der Leberzelle handelt, wurde unter anderen durch die Bestimmung der Relation Frischgewicht/Trockengewicht ausgeschlossen, die sich unverändert zeigte. Die Proteinkonzen-

Beeinflussung des Lebergewichts durch Applikation von Pharmaka

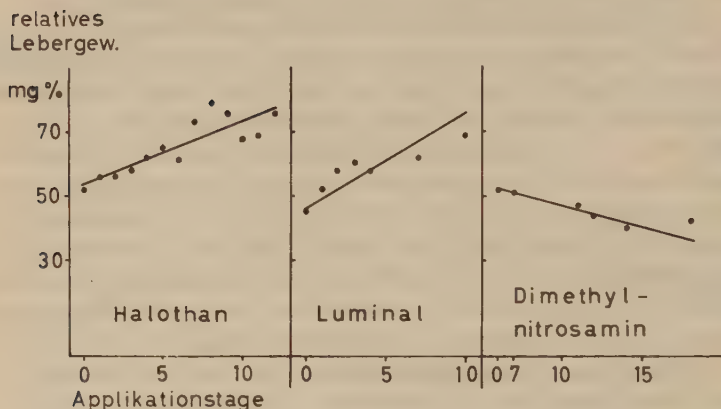


Abb. 14

tration mg pro g Organgewicht blieb konstant (Abb.16, Tab. XIV). Die Proteingehalte der Gesamtleber stiegen demzufolge der Organgewichtszunahme parallel laufend an. Der Anstieg der Proteingehalte setzte am zweiten Tag der Applikation ein und war etwa nach einer Woche bei Erreichen der maximalen Lebergröße abgeschlossen (Abb.15).

Die summarisch bestimmten freien Nucleotide zeigten - wie aus Tabelle XIII hervorgeht - in der Gesamtleber schon nach einmaliger Luminalapplikation eine Zunahme der Gehalte, die am zweiten Tag noch deutlicher wurde, am dritten Tag wieder etwas abfiel, jedoch immer noch oberhalb der Normalwerte lag. Die Gehalte der freien Nucleotide stiegen dann weiter an bis zu einem neuen Niveau, das zum Zeitpunkt der größten Protein- und Gewichtszunahme erreicht wurde.

Die RNS-Gehalte verhielten sich ähnlich wie die der freien Nucleotide. Schon in den ersten Tagen setzte eine deutliche Synthese ein, die zu einem den Proteingehalten annähernd par-

allel laufenden Anstieg der Gesamtgehalte führte. Auch hier wurde das Maximum zum Zeitpunkt der maximalen Organvergrößerung etwa am zehnten Tage erreicht (Abb. 15).

Beeinflussung von Protein- und Nukleinsäuregehalten durch chronische Applikation von 100mg/kg Phenobarbital.

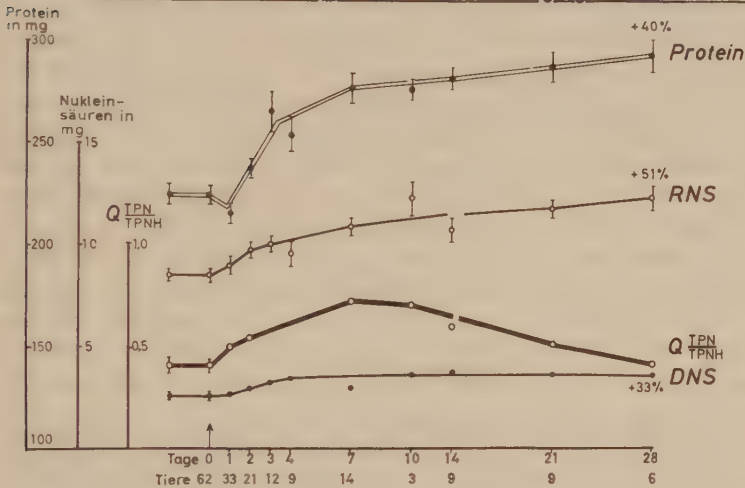


Abb. 15

Die DNS-Synthese setzte deutlich später ein. Es ist von Interesse, daß der Synthesebeginn hier zeitlich mit dem vorübergehenden Abfall der freien Nucleotide zusammenfällt. Dieses Phänomen wurde in synchronisierten Hefekulturen (Diss. JACOBI) und in der nach Teilhepatektomie regenerierenden Leber ebenfalls gefunden (SCHÖNBERGER); es scheint trotz der bei unseren Versuchen schwachen Ausprägung Ausdruck einer Gesetzmäßigkeit zu sein. Die größte Erhöhung der Gesamt-DNS-Gehalte wurde wie

Gehalte pro 1g Leber

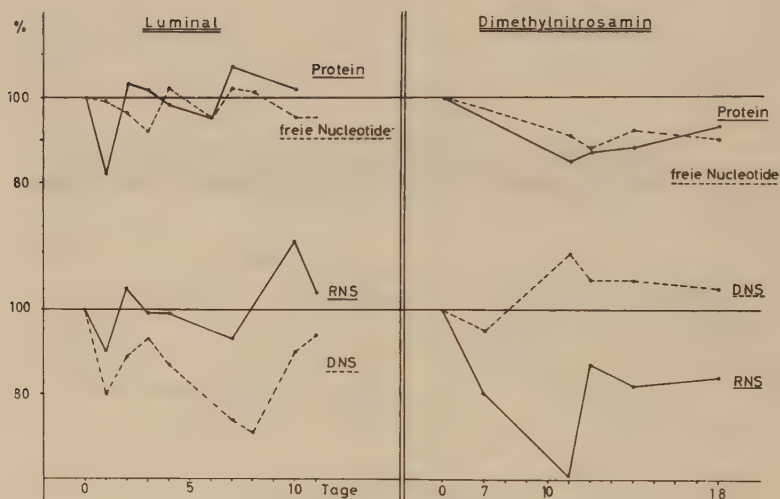


Abb. 16

bei den anderen Zellbestandteilen mit der maximalen Lebervergrößerung erreicht. Quantitativ blieb die DNS-Zunahme jedoch deutlich hinter dem Anstieg der Protein- und RNS-Gehalte zurück (Abb. 15).

Die Relationen der Zellbausteine während der Vergrößerungsphase werden durch die Darstellung der Stoffkonzentrationen, also durch die Angabe in mg/g Lebergewicht verdeutlicht (Abb. 16). Es zeigt sich deutlich, daß die Vermehrung von RNS und freien Nucleotiden ungefähr der Lebervergrößerung parallel verläuft. Die Synthese der freien Nucleotide setzt also bedeutend eher ein als die der Pyridinnucleotide (Abb. 9, Abb. 16). Anders verhielt sich die DNS. Sie scheint in den ersten Tagen der Behandlung nur wenig in die Synthese einbezogen zu werden. Entsprechend nimmt ihre Konzentration bei konstantem Gesamt-

gehalt ab (Abb.16). Diese Befunde decken sich mit den histologischen Bildern, die nach vierzehntägiger Applikation von 100 mg/kg Luminal eine ausgeprägte Vergrößerung des Cytoplasma=raumes zeigten. Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung sind dabei die plasmatischen Strukturen deutlich vermehrt. Es imponiert vor allem eine starke Zunahme der sog. "smooth membranes", also der endoplasmatischen Strukturen, die Sitz der Metabolisierungsenzyme sind. Die mit Ribosomen besetzten "rough membranes" sind ebenfalls, jedoch nicht im gleichen Maße vermehrt. Die "smooth membranes" enthalten vorwiegend Lipide, Protein und wenig RNS, die "rough membranes" besitzen hohe RNS-Gehalte. Der dem Proteinzuwachs annähernd entsprechende Anstieg der RNS-Gehalte dürfte vor allem auf die Vermehrung dieser Strukturen zurückzuführen sein. Die Kernvolumina zeigten sich gering vergrößert, blieben aber gegenüber der Zunahme der Plasmaräume weit zurück, so daß es zu einer deutlichen Verschiebung der Kern/Plasma-Relation kam. Das Absinken der DNS-Gehalte ist hierdurch erklärt. Da nach histometrischen Untersuchungen von SIESS (34), PREISS (27) u.a. die Zellzahl der bei Luminalapplikation sich vergrößernden Leber konstant bleibt, muß die bei unseren Analysen gefundene, bis 20 Prozent betragende Erhöhung der DNS-Gehalte (Tab.XIII) auf der Vermehrung der DNS des Einzelkerns beruhen. Die interessante Frage, ob es sich hier um Polyploidisierung oder um aneuploide Kernveränderungen handelt, kann aus diesen Bestimmungen, die ja eine Integration aller Leberzellen wiedergeben, nicht entschieden werden. Für ihre Beantwortung wären DNS-Bestimmungen an Einzelkernen erforderlich.

Die Verschiebung des TPN/TPNH-Quotienten trat nach Phenobarbitaleinwirkung schon sehr frühzeitig auf. Eine Abnahme der TPNH-Gehalte war schon am ersten Tag der Applikation sicher nachzuweisen. Durch weitere Erniedrigung von TPNH und gleichzeitigen Anstieg von TPN stieg der Quotient dann weiter an. Die deutlichsten Redoxverschiebungen fielen in die Phase des stärksten Leberwachstums. Nach Erreichen der maximalen Lebergröße normalisierte sich die Redoxrelation zunehmend und lag nach vier Wochen, nach Abschluß des Leberwachstums, wieder im

Normbereich (Abb.15). Die vor allem auf dem Anstieg der TPNH-Gehalte beruhende Normalisierung der Redoxlage fiel zeitlich mit dem Beginn der Neusynthese von Pyridinnucleotiden zusammen.

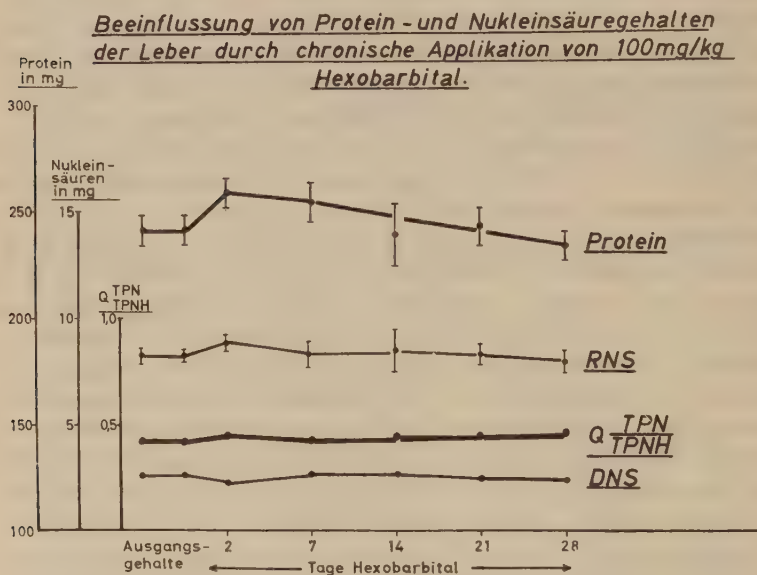


Abb. 17

Vergleichend wurden dieselben Bausteinanalysen bei Einwirkung von Hexobarbital, das keine Lebervergrößerung induziert, durchgeführt. Die Abb.17 zeigt, daß es auch hier zu geringen Erhöhungen von Protein und RNS kommt, die jedoch zu keiner wesentlichen Zellvergrößerung führen.

2. Halothan

Wie bei den Luminalversuchen fanden wir auch bei Halothan= einwirkung schon vom ersten Tage an eine Zunahme des Leberge=

wichts (Abb.14, Tab.XIV). Diese Gewichtszunahme war in den ersten Tagen allerdings gering und stieg dann am vierten und fünften Tag steil an. Die Organzunahme in den ersten Tagen muß vor allem auf die Einlagerung von Fett zurückzuführen sein, da eine sichere Erhöhung der Proteinsynthese erst mit Beginn der steilen Wachstumsphase nachgewiesen werden konnte. Die Proteinkonzentrationen blieben in der ganzen Beobachtungszeit im Normbereich und schienen nach dem elften Behandlungstag sogar leicht erhöht (Abb.19). Die Proteingehalte der Gesamtleber stiegen entsprechend beträchtlich an und betrugen schon am sechsten Applikationstag 140 % der Norm (Abb.18). Eine gewisse, wenn auch nicht so deutlich wie beim Luminal ausgeprägte, Abhängigkeit zur Verschiebung des Redoxverhältnisses im TPN-System war auch hier zu finden. Bis zum dritten Tag, d.h. in der Phase des negativer werdenden TPN/TPNH-Quotienten, waren Konzentration und Gesamtgehalt des Proteins völlig unverändert,

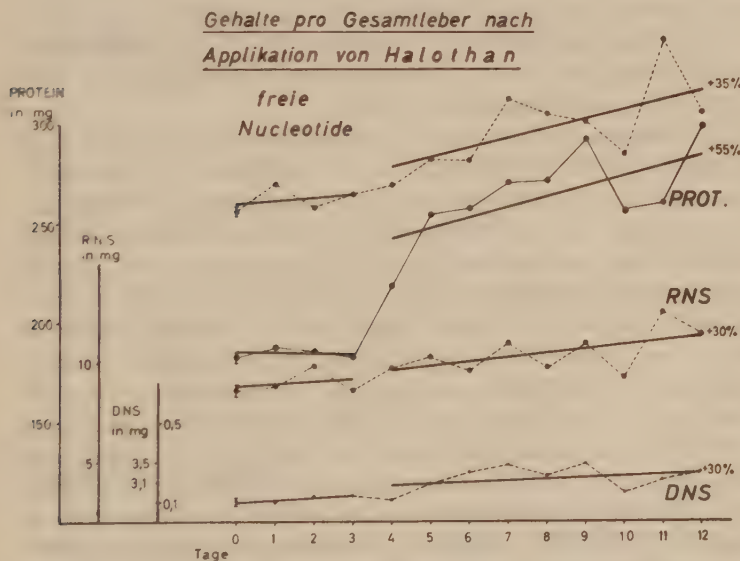


Abb. 18

während der steile Anstieg der Eiweißgehalte zeitlich ungefähr mit der langsamen Positivierung des Quotienten zusammenfiel (Abb.18).

Ein bemerkenswerter Befund ist in diesem Zusammenhang, daß zum Zeitpunkt der sprunghaft am vierten Behandlungstag einsetzenden Synthese, die Glucose-6-phosphat-Gehalte drastisch absinken. Da zum gleichen Zeitpunkt jedoch trotz der Verschiebung des TPN/TPNH-Quotienten keine Steigerung der C_1 -Dekarboxylierung der Glucose, sondern eine Erniedrigung der $C^{14}O_2$ -Abspaltung sowohl aus C_1 - als auch aus C_6 -S tellung gefunden wurde, muß angenommen werden, daß es in dieser Phase der sehr starken Protein- und Lipidsynthese zu einem erheblich gesteigerten Einbau von CO_2 kommt.

Das dürfte im Zusammenhang mit der ungewöhnlich starken Aktivierung des Malic enzyme stehen (SCHIMASSEK et al., 31), die nach Halothaneinwirkung gefunden wird. Als eine Hauptfunktion dieses Enzyms wird die Fixierung von CO_2 bei der Protein- und Lipidsynthese angesehen (TEPPERMAN und TEPPERMAN, 35, 36). Die Diskrepanz zwischen der Veränderung der cytoplasmatischen TPN/TPNH-Relation und der Aktivität des Pentosephosphat-shunt könnte darin eine Erklärung finden.

Die Gesamtgehalte der freien Nucleotide stiegen nach Halothaninhalation in der Leber steil an, und auch für die RNS fanden wir eine, allerdings weniger ausgeprägte, Vermehrung. Die Gesamt-DNS war, im Unterschied zu den mit Luminal behandelten Tieren, vom ersten Tag an gering vermehrt und lag nach sechs Tagen etwa 20 % über der Norm (Abb.18, Tab.XIX u. XX). Die Konzentration der freien Nucleotide lag ständig im Normbereich, was einer Synthese parallel der Lebervergrößerung entspricht. Die DNS und - anders als beim Luminal - auch die RNS waren in ihrer Konzentration vom dritten Behandlungstag an deutlich erniedrigt, was schon auf gewisse Differenzierungen im Zellwachstum nach Behandlung mit beiden Pharmaka hinweist. Die DNS-Konzentration war am elften Behandlungstag am geringsten (- 28 %), stieg dann langsam an und lag nach 30 Tagen mit 92 % nur wenig unter der Norm. Die RNS-Werte zeigten hingegen keinerlei ansteigende Tendenz. Sie waren nach

30 Tagen auf 77 % erniedrigt (Abb.19, Tab. XXI und XXII).

In der Leber der mit Halothan behandelten Tiere finden sich histologisch und histometrisch sehr ähnliche Kern- und Plasma= veränderungen wie nach Luminal, die auch hier dem Anstieg der Protein- und DNS-Gehalte quantitativ entsprechen. Im Einklang mit unseren Untersuchungen fand sich histologisch eine deut= liche cytoplasmatische Fettvermehrung.

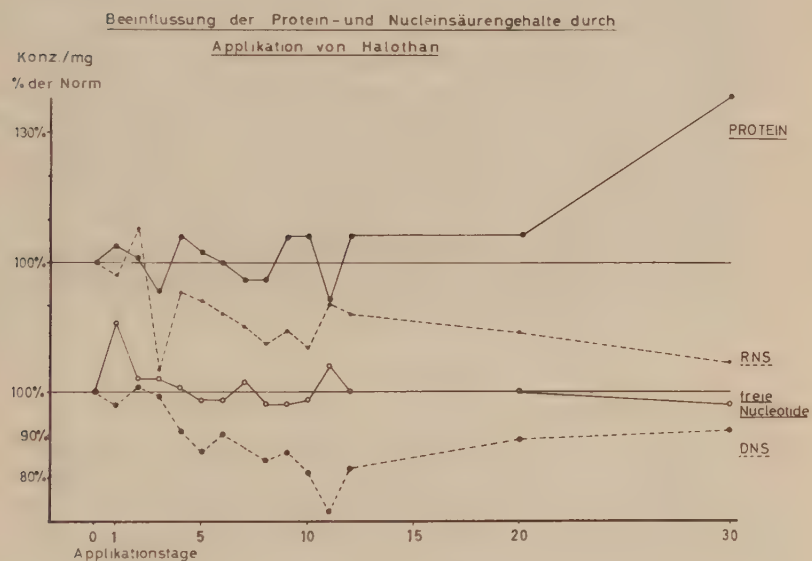


Abb. 19

3. Dimethylnitrosamin

Das relative Lebergewicht der mit Dimethylnitrosamin behandelten Tiere verringerte sich während der fortlaufenden Applikation ständig (Abb.14, Tab.XXVIII). Entsprechend fanden wir eine deutliche Verringerung des Gesamtproteingehaltes

Gehalte pro Gesamtleber nach Applikation von
Dimethylnitrosamin

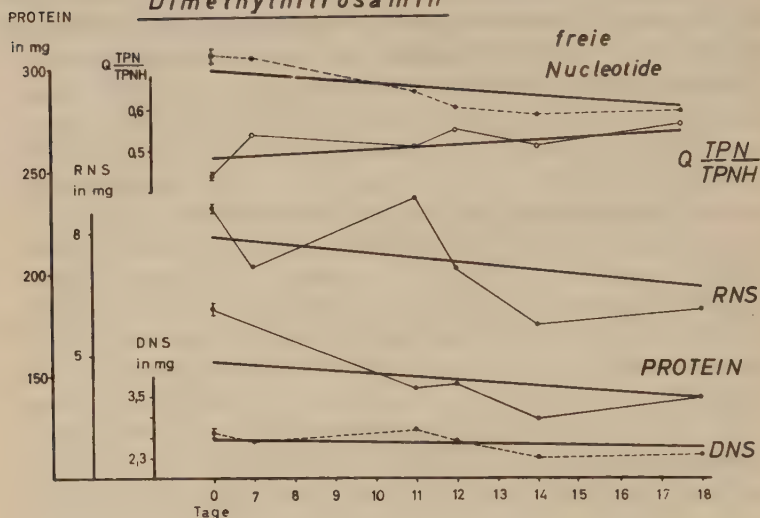


Abb. 20

(Abb.20, Tab. XXVIII), der eine Abnahme der Gesamtmenge der Pyridinnucleotide parallel lief (Abb.11, Tab. XXIV u. XXVI). Da auch die Proteinkonzentrationen reduziert waren (Abb.16), weist dies, zusammen mit den schon vorher beschriebenen Befunden, auf überstürzte Abbauvorgänge hin, mit denen etwa bestehende Synthesen nicht Schritt zu halten vermögen. Ein völlig neues Bild bot sich bei der Betrachtung der Nucleinsäuren. Die Veränderung der Gehalte der freien Nucleotide und der Nucleinsäuren verlief nämlich nicht parallel zur Verschiebung des Redoxverhältnisses TPN/TPNH, wie es nach Halothan und nach Luminal zu beobachten war, sondern entgegengesetzt (Abb.20). Auch kommt es hier im Laufe der Abnahme von Lebergewicht und Protein in der Gesamtleber zu einer ausgeprägten Verringerung der Gesamtnucleotide und der Nucleinsäuren.

Zu Beginn unserer Beobachtungszeit, d.h. am 7. Applikations=tag, waren diese Veränderungen noch sehr gering. Nach vierzehn Tagen fanden wir RNS und freie Nucleotide um über 30 %, die DNS um 15 % verringert. Erstere war auch in ihrer Konzentra=tion pro Gramm Leber ständig erniedrigt. Nur die DNS zeigte sich leicht erhöht, was einen besonderen Unterschied zu den verminderten DNS-Werten nach Luminal- und Halothanapplikation darstellt (Abb.16, Tab. XXVII).

Histologisch zeigt die unter Dimethylnitrosamineinwirkung stehende Mäuseleber eine deutliche Verringerung der Plasmavo=lumina, während die Kerne in ihrer Größe stark variieren. Die Mitoserate ist erhöht, es treten vermehrt Amitosen und auffal=lend großkernige Zellen auf. Sehr exakte Analysen der Kern=und Zellvariationen sind hier von BÜCHNER und GRUNDMANN (5) durchgeführt worden. Elektronenmikroskopische Bilder von FIALA (12) zeigen, daß das endoplasmatische Retikulum schon in den frühen Stadien der Einwirkung kontinuierlich abnimmt und nach drei bis vier Wochen beinahe völlig fehlt. Die von uns beobachtete starke Abnahme der RNS-Gehalte dürfte ein Äqui=valent der zunehmenden Strukturverarmung der Zelle sein.

D. Diskussion der Ergebnisse

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, die Frage zu prüfen, ob die nach Applikation von zahlreichen Fremdstoffen mit sehr heterologen biologischen und physikochemischen Eigenschaften auftretende Lebervergrößerung ursächlich mit der Metabolisierung dieser Stoffe in den Lebermikrosomen zusammenhängt.

Alle Reaktionen der Fremdstoffmetabolisierung benötigen nach den Untersuchungen von BRODIE u. Mitarb. (7,8) TPNH und Sauerstoff. Da dem TPN-System eine zentrale Bedeutung für zahlreiche Stoffsynthesen der Zelle zukommt, war eine Wirkung über die Beeinflussung TPN-TPNH-abhängiger Regulationen durchaus denkbar. Die zunächst zu prüfende Voraussetzung für einen derartigen Wirkungszusammenhang war, daß durch eine starke Beanspruchung der mikrosomalen Metabolisierungssysteme der extramitochondriale TPN-Umsatz überhaupt in einem wesentlichen Ausmaß beschleunigt wird. Das ist von GILLETTE et al. (14) auf Grund von Untersuchungen über den TPNH-Verbrauch der Methylaminoantipyrin-Demethylierung durch isolierte Mikrosomen verneint worden. Diese Untersuchungen erlauben jedoch aus mehreren, bereits erwähnten Gründen keinen Rückschluß auf die Verhältnisse in der unversehrten Zelle. Unsere Analysen, die durch Anwendung der C_1/C_6 -Methode die Bestimmung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes auch in der Ganzzelle ermöglichten, erbrachten von den Folgerungen GILLETTEs abweichende Ergebnisse.

Bei Inkubation der Pharmaka mit Leberschnitten unbehandelter Tiere in vitro ließ sich eine sichere Steigerung der C_1 -Dekarboxylierung und damit des extramitochondrialen TPN-Umsatzes nachweisen. Das Ausmaß dieser Steigerung war abhängig von der Metabolisierungsgeschwindigkeit der Substanzen. So bewirkte das sehr rasch abgebaute Hexobarbital eine Umlaufsteigerung auf 210 Prozent der Norm, während das langsam hydroxylierte Phenobarbital nur eine 25%ige Umlaufsteigerung zur Folge hatte. Diese Abstufung, die wir auch nach anderen Pharmaka beobachteten, macht es wahrscheinlich, daß bei in vitro Zusatz die Erhöhung der C_1 -Dekarboxylierung auf dem

stöchiometrischen TPNH-Verbrauch der mikrosomalen Metabolisierung beruht.

Auch die unmittelbar nach in vivo Applikation auftretende Steigerung des TPN-Umsatzes, die im wesentlichen die gleichen Abstufungen wie die in vitro-Versuche zeigte, dürfte eine echte Substratwirkung darstellen. Dafür sprechen Ausmaß und zeitlicher Verlauf der Umlauferhöhung.

Für die lang anhaltende Steigerung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes, die bei chronischer Zufuhr einiger Pharmaka, besonders nach Phenobarbital, beobachtet wurde, müssen dagegen andere Mechanismen angenommen werden. Es ist, trotz der nachgewiesenen Kumulation von Luminal in der Leber, quantitativ unmöglich, daß die noch 24 Stunden nach der Applikation in der Zelle haftenden Phenobarbitalmengen durch ihren Abbau eine Umsatzerhöhung in der beobachteten Größenordnung bewirken. Für eine Steigerung des TPNH-Verbrauchs durch die eigentliche Stoffmetabolisierung müßte in diesem Falle die Ausbildung reversibler Redoxsysteme angenommen werden, die einen Kreisprozeß unterhalten. Ein derartiger Mechanismus ist für Phenylendiamine, Azobenzole und Fluorene nachgewiesen. Als Derivat des Phenobarbitals mit Redoxwirksamkeit wäre die Entstehung eines Chinonderivats über das Hydroxyphenobarbital denkbar. Dafür bestehen jedoch bisher keine experimentellen Hinweise. Zudem ist bei anderen Stoffen wie Eunarcon, Pentobarbital, Barbitat u.a., die den TPN-Umsatz ebenfalls erhöhen, die Biosynthese ähnlicher Metabolite mit Redoxfunktion nicht möglich. Wahrscheinlich hingegen ist die Ausbildung eines reversiblen Redoxsystems nach Applikation des bei unseren Versuchen sehr stark wirksamen Dimethylnitrosamin, das zu einer beträchtlichen Erhöhung der C₁-Dekarboxylierung führte. Eine Redoxfunktion des hier anzunehmenden Systems



ist von LIPSCHITZ (25), KIESE u.a. nachgewiesen worden. Das sehr positive Potential dieses Systems bewirkt dabei nicht nur einen Abfluß von Wasserstoff aus dem negativen TPN-System, sondern vermag auch als Wasserstoffakzeptor der positiveren DPN- und Flavinsysteme zu fungieren.

Eine wahrscheinlichere Erklärung für die lang anhaltende Steigerung des extramitochondrialen TPN-Umsatzes bei Einwirkung von Barbituraten ergibt sich aus der Beobachtung REMMERS (30), daß unter gleichen experimentellen Bedingungen eine Aktivierung der Mikrosomenenzyme erfolgt, die auf Enzymneubildung beruht, und vor allem nach Phenobarbital zu einer Vermehrung der "smooth membranes" des endoplasmatischen Retikulums führt. Als erster Schritt dieser Enzyminduktion findet sich schon nach wenigen Stunden ein Ansteigen der mikrosomalen Cytochrome, die das erste Glied des TPNH-oxydierenden Enzymkomplexes darstellen. Für diese Deutung der Erhöhung des cytoplasmatischen TPN-Umsatzes spricht, daß die Steigerung der TPNH-Oxydaseaktivität zeitlich und in der Größenabstufung bei allen geprüften Substanzen mit der Erhöhung der C_1 -Dekarboxylierung übereinstimmt.

Hexobarbital, das bei in vivo-Applikation nur eine rasch abklingende Erhöhung des TPN-Umsatzes hervorruft, ist nicht in der Lage, die TPNH-Oxydase nachhaltig zu aktivieren. Bei chronischer Anwendung beschleunigt es lediglich seinen Eigenabbau. Darauf dürfte die Beobachtung zurückzuführen sein, daß bei wiederholter Applikation gleicher Dosen die von uns gemessene C_1 -Dekarboxylierung scheinbar immer geringer wurde. Aus methodischen Gründen lag zwischen Injektion und Meßbeginn ein Zeitraum von 30 Minuten. Nach Blutspiegelbestimmungen kann sicher angenommen werden, daß zu Versuchsbeginn bei chronisch vorbehandelten Tieren erheblich geringere Evipanmengen als Substrat zur Verfügung stehen, als bei den Untersuchungen nach erstmaliger Injektion der gleichen Dosis.

Zusammenfassend können unsere Befunde dahingehend gedeutet werden, daß die Erhöhung des TPN-Umlaufs in vitro und die rasch abklingende Wirkung nach Applikation in vivo eine direkte Folge der Substratmetabolisierung sind, deren Umfang von der Metabolisierungsgeschwindigkeit der Substanzen bestimmt wird. Die lang anhaltende Aktivierung nach chronischer Zufuhr geht der Fähigkeit der Stoffe zur Mikrosomeninduktion parallel und ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Steigerung der TPNH-oxydaseaktivität zurückzuführen.

Die Shuntaktivierung durch Halothan, das nur sehr gering

metabolisiert wird und die Mikrosomenaktivität eher hemmt, kann auf diese Weise nicht erklärt werden. Die hier möglichen Mechanismen werden weiter unten diskutiert.

Die zweite zu prüfende Frage war, ob diese sicher nachgewiesene Steigerung des TPNH-Verbrauchs durch die TPNH-regenerierenden cytoplasmatischen Enzyme kompensiert werden kann, oder ob sie zu einer Veränderung der Redoxlage des TPN-Systems führt und damit in der Lage ist, weitere, von diesem System abhängige, Regulationen zu beeinflussen.

Die daraufhin durchgeführten Versuche zeigten, daß durch den stöchiometrischen TPNH-Bedarf der eigentlichen Metabolisierungsreaktionen, auch bei extremer Substratbelastung der Leber, die Redoxlage des TPN-Systems nicht geändert wird. Der langanhaltende Abfluß von TPNH-Wasserstoff nach Einwirkung mikrosomeninduzierender Stoffe, kann jedoch offenbar durch die TPNH-regenerierenden Enzyme der normalen Leberzelle nicht mehr kompensiert werden. Es kommt zum kontinuierlichen Abfall der stationären TPNH-Gehalte und damit zur Verschiebung der TPN-Redoxlage nach der oxydierten Seite. Das war besonders ausgeprägt bei Phenobarbital und bei Prominal. Bei den übrigen untersuchten Substanzen war die Veränderung des Redoxgleichgewichtes geringer und entsprach etwa der Erhöhung des TPN-Umsatzes und der Steigerung der TPNH-Oxydase. Bei einigen Stoffen fehlte sie ganz (Abb.21, S.60).

Bei Halothan zeigte sich schon zu einem Zeitpunkt eine Abnahme des TPN-Reduktionsgrades, zu dem der mit der C_1/C_6 -Methode gemessene cytoplasmatische TPN-Umsatz noch nicht gesteigert war. Das unterschiedliche Verhalten der alkalilöslichen und der mit Alkali-Alkohol extrahierbaren TPNH-Fractionen machten es, ebenso wie die Pyridinnukleotidbestimmung in den einzelnen Zellfraktionen, wahrscheinlich, daß das primär TPNH verbrauchende Prinzip hier mitochondrial lokalisiert ist. Im Gegensatz zu den Barbitalen fanden sich die ausgeprägtesten Redoxveränderungen hier im Mitochondrialraum. SCHIMASSEK u.a. (31) fanden in diesen Stadien der Halothaneinwirkung eine mehrfache Erhöhung der Aktivität des Malic-Enzyms. Es ist denkbar, daß diese Aktivierung des schon in der normalen Leber "großen TPN-Enzyms" Ursache der Redoxverschiebung nach Halothanbehand-

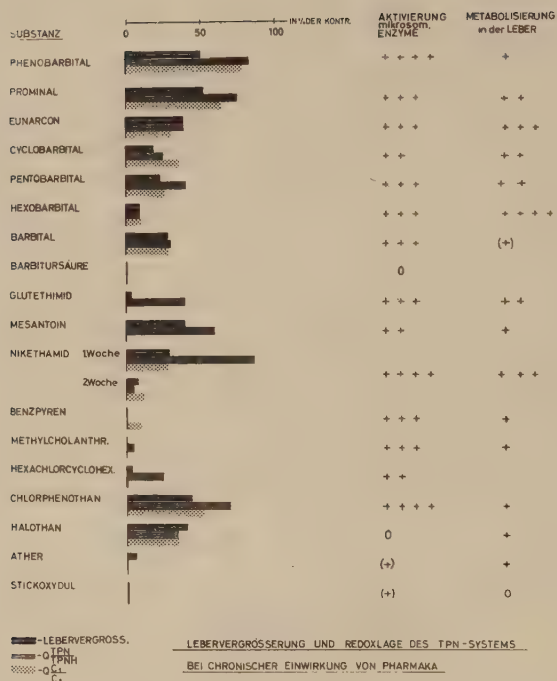


Abb. 21

lung ist. Des weiteren muß auch an die Steigerung der TPN-abhängigen Enzyme des Fettsäurestoffwechsels gedacht werden, der ja durch Halothan schon sehr frühzeitig beeinflusst wird.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es sicher, daß durch chronische Einwirkung von Pharmaka der cytoplasmatische TPNH-

Verbrauch in einem Ausmaß gesteigert werden kann, das zu einer nachhaltigen Änderung der Redoxlage des TPN-Systems führt. Die Fähigkeit der untersuchten Fremdstoffe, Leberwachstum auszulösen, geht der Veränderung dieser Reaktionen parallel. Es darf danach angenommen werden, daß ursächliche Beziehungen zwischen der Veränderung des TPN-Stoffwechsels und dem Organwachstum bestehen.

Die abschließend geprüfte Frage nach dem primären Auslösemechanismus konnte jedoch experimentell nicht sicher geklärt werden. Bei der Annahme, daß die veränderte Redoxlage des TPN-Systems eine initiale Reaktion darstellt, wäre nach unseren derzeitigen Kenntnissen eine Wirkung vor allem über die Beeinflussung der Nucleotid- und Nucleinsäuresynthese denkbar. Bei der Wachstumsauslösung in Hefezellen konnte eine Kausalkette TPNH-Oxydation $\longrightarrow$ Steigerung des Pentosephosphat-Shunts $\longrightarrow$ erhöhte Nucleotidbildung $\longrightarrow$ Nucleinsäuresynthese nachgewiesen werden. Es gelang uns jedoch nicht, eine analoge Reaktionsabfolge bei dem durch Pharmaka induzierten Leberwachstum nachzuweisen. Die vermehrte TPNH-Oxydation und die Redoxverschiebung des TPN/TPNH-Quotienten fielen hier zeitlich mit der Phase der erhöhten Synthesen von Nucleotiden, Nucleinsäuren und Protein zusammen. Das Wachstum und die Vermehrung der Leberzellen erfolgt sicher so wenig synchron, daß bei der chemischen Analyse des ganzen Organs eine Integration von Zellen in den verschiedensten Stadien erfaßt wird. Bei der auch in synchronisierten Gewebeskulturen nachweisbaren, raschen Aufeinanderfolge der einzelnen Syntheseschritte ist es deshalb nicht möglich, eine zeitliche Reihenfolge der Reaktionen abzugrenzen.

Aus den Analysen der Synthesevorgänge können jedoch verschiedene Wirkungsgruppen der Pharmaka sicher unterschieden werden. Es ließ sich deutlich die durch Mikrosomenaktivierung wirksame Gruppe der Barbiturate von Halothan und dem carcinogenen Dimethylnitrosamin abgrenzen. Die bei den Versuchen eingehend dargestellten Charakteristika der einzelnen Stoffgruppen lassen es aussichtsreich erscheinen, durch die Erfassung geeigneter biochemischer Parameter Kriterien zu erhalten, die zu einer verlässlichen Beurteilung der zur Zeit methodisch noch

außerordentlich schwer zu erfassenden chronisch-toxischen Wirkung von Fremdstoffen beitragen. Es scheint nach den Ergebnissen vor allem möglich, hepato-carcinogene Substanzen schon nach kurzer Einwirkung zu erkennen.

E. Zusammenfassung

Chronische Applikation zahlreicher Fremdstoffe mit sehr unterschiedlichen chemischen und pharmakologischen Eigenschaften, wie Barbiturate, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Halogenkohlenwasserstoffe, führt bei der weißen Maus zu einer starken, auf Zellhypertrophie beruhenden Lebervergrößerung. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob dieses Phänomen auf einer starken Dauerbeanspruchung der TPNH-verbrauchenden Metabolisierungsenzyme beruht; es sollten weiterhin erste Anhaltspunkte über den möglichen Wirkungsmechanismus gewonnen werden.

Zur Beurteilung dieser Fragen bestimmten wir, nach in vivo und nach in vitro Applikation der Pharmaka Hexobarbital, Phenobarbital, Halothan und Dimethylnitrosamin, in der Leber von Albinomäusen:

1. in vivo mit enzymatischen Methoden die Pyridinnucleotidgehalte in Zellen und Zellfraktionen,
2. durch Anwendung different markierter C^{14} -Glucose die Aktivität des Pentosephosphat-Zyklus als Maß des extramitochondrialen TPN-Umsatzes,
3. mit chemischen Methoden die Gehalte von Protein, DNS, RNS und von freien Nucleotiden.

Wir erhielten folgende Ergebnisse:

1. Die Metabolisierung von Fremdstoffen durch die mikrosomalen Abbausysteme der Leber führt nach Zugabe in vitro und nach Applikation in vivo zu einer Steigerung des cytoplasmatischen TPN-Umsatzes. Bei rasch abgebauten und eliminierten Stoffen wie Hexobarbital ist die Steigerung in vivo kurz. Hier kann nach stöchiometrischen Abschätzungen als Ursache eine reine Substratwirkung angenommen werden. Bei chronischer Einwirkung kommt es zu keiner bleibenden Steigerung der TPNH-Oxydation.
2. Eine lang anhaltende und ausgeprägte Steigerung des TPNH-Umsatzes findet sich dagegen bei chronischer Anwendung von

Phenobarbital, das bei akuter Einwirkung und in vitro nur wenig wirksam ist. Es ist quantitativ nicht möglich, daß dieser Effekt auf der eigentlichen Stoffmetabolisierung beruht. Wahrscheinlicher ist hier, daß dafür die durch Phenobarbital ausgelöste Aktivierung der mikrosomalen TPNH-Oxydase verantwortlich ist. Dafür sprechen die zeitliche Übereinstimmung zwischen Erhöhung der TPNH-Oxydaseaktivität und Steigerung der C₁-Dekarboxylierung, sowie die quantitative Übereinstimmung beider Wirkungen. Ähnlich wie Phenobarbital verhält sich Prominal; Eunarcon, Cyclobarbitol, Barbitol und Chlorphenotan wirken weniger stark.

3. Halothan erhöht den cytoplasmatischen TPN-Umsatz im akuten Versuch nicht. Erst nach chronischer Einwirkung - zeitlich mit der Phase des stärksten Zellwachstums übereinstimmend - kommt es zu einer geringen Oxydationssteigerung.

4. Unter Dimethylnitrosamin kommt es in vitro und in vivo zu einer vermehrten C₆-Dekarboxylierung im Citrat-Zyklus und zu einer enormen Umlauferhöhung des TPN-Systems. Als Ursache wird hier die Ausbildung eines reversiblen, TPNH- und DPNH-verbrauchenden Redoxsystems diskutiert.

5. Die Redoxlage des cytoplasmatischen TPN-Systems wird durch kurzdauernde Beanspruchung der Metabolisierungsreaktionen auch bei Anwendung sehr hoher Dosen nicht verändert. Erst bei chronischer Zufuhr von Luminal, Prominal, Cyclobarbitol und Halothan kommt es zu einer anhaltenden Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zugunsten der oxydierten Form. Die TPNH-Gehalte werden hierbei durch Phenobarbital stärker und zu einem früheren Zeitpunkt gesenkt als durch Halothan.

6. Die deutlichsten Veränderungen der Redoxlage des TPN-Systems nach Phenobarbital und Halothan fallen zeitlich mit der Phase des stärksten Zellwachstums zusammen. Es kommt dabei zuerst zu einer Vermehrung der Gesamtgehalte von RNS, Protein und der freien Nucleotide. Der Anstieg der DNS-Gehalte erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt.

7. Das Carcinogen Dimethylnitrosamin führt zu einem kontinuierlichen Absinken der Protein- und RNS-Gehalte, bei gleichzeiti-

ger Erhöhung der DNS-Konzentrationen. Die durch Pharmaka induzierte Leberhypertrophie läßt sich dadurch von cancerogenen Veränderungen abgrenzen.

8. Die Vermehrung von Protein und Nucleinsäuren nach Luminal- und Halothaneinwirkung entspricht quantitativ den histologischen Bildern, die eine unproportionierte Zellhypertrophie mit Verschiebung der Kern/Plasma-Relation zeigen.

F. Literaturverzeichnis

1. Arcos, I.C., A.H. Connes and N.P. Buu-Hoi Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular size.
J.Biol.Chem. 236. 1291 (1961)
2. Brachet in Nowinski, W.W.: Fundamental Aspects of normal and malignant growth.
New York 1960 (S.260)
3. Bücher, Beisenherz, Bolz, Czok, Garbade, Meyer-Arendt, Pfeleiderer Z.Naturforschung 8b, 555-557, (1953)
4. Bücher, Klingenberg Angew. Chem. 70. 552 (1958)
5. Büchner, Grundmann DMW 86. 1845 u. 1847 (1961)
6. Conney, A.H., C. Davison, R. Gastel and I.I. Burns Adaptive increase in drug metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.
J.Pharmacol.exp.Ther. 130. 1 (1960)
7. Cooper, J.R. a.B.B. Brodie J.Pharmacol.exp.Ther. 114. 409 (1955)
8. Cooper, J.R. a.B.B. Brodie J.Pharmacol.exp.Ther. 120. 75 (1957)
9. Dische Z.Mikrochemie 8. 4 (1938)
10. Dounce, A.L., R.F. Witter, K.J. Monty, S. Pate and M. Kottone J.Biophys.Biochem.Cytol. 1. 139 (1955)
11. Fouts, J.R. a.L.A. Rogers Morphological changes in the liver accompanying Stimulation of microsomal Drug Metabolizing Enzyme Activity by Phenobarbital, Chlordane, Benzpyrene and Methylcholanthrene in Rats.
J.Pharm.exp.Ther. 147. 112 (1965)
12. Fiala, S. u. H.E. Fiala Zit. nach Büchner et al.
DMW 86. 1845 (1961)
13. Gössner, W. u. H. Friedrich-Freksa Z.Naturforschg. 19b. 862-863 (1964)
14. Gillette, J.R., B.B. Brodie a. B.N. La Dur J.Pharmacol.exper. 119. 532 (1957)
15. Glock u. Mc Lean Biochem.J. 61. 395 (1955)
16. Hohorst in Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, S.134 (1963)
17. Holzer, Kröger, Busch Z.Physiol.Chem. 215. 184 (1958)

18. Hoops Dissertation, Marburg 1963
19. Jacobson, K.B. u. N.O. Kaplan J.Biol.Chem. 226. 603 (1957)
20. Jacobi Dissertation, Marburg 1965
21. Kato, R., G. Frontino a. P. Vasanelli Phenobarbital markedly increases liver weight in Walker carcinoma bearing rats. Experimentia (Basel) 19. 30 (1963)
22. Klingenberg in Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse (1963)
23. Kunz Habilitationsschrift, Marburg 1963
24. Kunz et al. Stimulation of liver growth by drugs. Proceedings of the European Society for the study of drug toxicity Nr. 7 Excerpta medica foundation, Amsterdam (1966)
25. Lippschitz, W. in Handbuch der biol. Arbeitsmeth. IV. 1. 439 (1925)
26. Maybaum Z. Physiol. Chem. 238. 117 (1939)
27. Preiss Dissertation, Marburg 1965
28. Racker J. Biol. Chem. 196. 347 (1952)
29. Remmer, H. u. H. J. Merker Vermehrte Bildung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle unter der Wirkung von Arzneimitteln. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 245. 76 (1963a)
30. Remmer, H. u. H. J. Merker Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital. Klin. Wochschr. 41. 276 (1963b)
31. Schimmassek, H., W. Kunz u. H. J. Gallwitz Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 251. 2 (1965)
32. Schmied Zellwachstum und Zellvermehrung bei Hefe Biochem. Z. 329. 560 (1958)
33. Schneider, W. C. J. Biol. Chem. 176. 259 (1948)
34. Siess Archiv f. exp. Pharm. u. Path. Band 247. 367 (1964)
35. Tepperman, H. M. a. J. Tepperman Am. J. Physiol. 206. 357 (1964)

36. Tepperman, H.M. a. J. Tepperman Diabetes 7. 478 (1958)
37. Wilson, J.W. a. E.H. Leduc The Effect of Coramine on Mitotic Activity and Growth in the Liver of Mouse. Growth 14. 31 (1950)

Tab. I: Beeinflussung der Glucose-6-phosphatoxydation durch
Einwirkung von Halothan und Dimethylnitrosamin
in vivo

	Dosis	Zeit	n	C ₁	C ₆	C ₁ /C ₆	C ₁ -C ₆
Kontrolle	-	-	38	1755	741	2,36	1014
Halothan	2 x	2 Tage	5	1770	820 110%	2,16	950 93%
Halothan	4 x	4 Tage	5	1033	385	2,68	648 63%
Halothan	5 x	5 Tage	6	1586	690	2,30	896 88%
Halothan	6 x	6 Tage	6	1314	546	2,40	768 75%
Halothan	7 x	7 Tage	6	1189	488	2,49	701 69%
	35 x	5 Wochen	6	1895	685	2,76	
Dimethyl= nitrosamin	in vitro	-	6	3358	1351	2,48	2007 197%
Dimethyl= nitrosamin	1 x	1 Tag	6	2390	1043	2,29	1347 132%
Dimethyl= nitrosamin	2 x	2 Tage	5	3402	2408	1,41	994 98%
Dimethyl= nitrosamin	5 x	5 Tage	3	3990	3098	1,29	892 87%
Dimethyl= nitrosamin	7 x	7 Tage	6	3970	1319	3,01	2651 261%
Dimethyl= nitrosamin	8 x	8 Tage	5	3601	1827	1,97	1774 174%

Tab. II: Beeinflussung der Glucose-6-phosphatoxydation
durch Einwirkung von Evipan

	Dosis	Zeit	n	C ₁	C ₆	C ₁ /C ₆	C ₁ -C ₆	C ₁ +C ₆
Kontrolle	-	-	38	1755	741	2,36	1014	2496
Evipan	in vitro	-	12	4666	935	4,99	3731 367%	5601
Evipan	1 x	nach 30min	6	4151	1338	3,1	2813 277%	5489
Evipan	1 x	nach 3 h	6	3516	1803	1,95	1713 168%	5319
Evipan	1 x	nach 16 h	6	3841	1602	2,39	2239 220%	5443
Evipan	2 x	nach 30min	6	3075	874	3,51	2201 217%	3949
Evipan	2 x	nach 3 h	6	2491	753	3,30	1738 171%	3244
Evipan	8 x	nach 30min	6	4259	1946	2,18	2313 228%	6205

Tab. III: Beeinflussung der Glucose-6-phosphatoxydation
durch Einwirkung von Luminal

	Dosis	Zeit	n	C ₁	C ₆	C ₁ /C ₆	C ₁ -C ₆
Kontrolle	-	-	38	1755	741	2,36	1014
Luminal	in vitro	-	11	4245	1430	2,96 +25%	2815 277%
Luminal	1 x	1 Tag	6	3110	1026	3,03 +28%	2084 205%
Luminal	2 x	2 Tage	12	1570	319	4,92 +108%	1251 123%
Luminal	3 x	3 Tage	12	1390	292	4,76 +100%	1098 108%
Luminal	4 x	4 Tage	4	2220	435	5,10 +116%	1785 176%
Luminal	7 x	7 Tage	6	2350	572	4,10 +73%	1778 175%
Luminal	8 x	8 Tage	6	2259	458	4,91 +108%	1801 177%

Tab. IV: O₂-Verbrauch isolierter Leberschnitte nach intra-
peritonealer Applikation von 150 mg/kg Evipan

	n	Zeit	Q O ₂	σM	Signifi- kanz	% Verän- derung
Kontrolle	38	-	7,416	0,278	-	-
Evipan	12	in vitro	8,613	0,109	+++	116%
1 x Evipan	6	nach 30 min.	10,453	0,386	+++	140%
1 x Evipan	6	nach 3 h	9,595	0,152	+++	129%
1 x Evipan	6	nach 16 h	9,429	0,218	+++	127%
1 x Evipan	6	nach 40 h	8,111	0,356	-	109%
2 x Evipan	6	nach 30 min.	6,932	0,503	-	93%
2 x Evipan	6	nach 3 h	6,121	0,559	-	82%
8 x Evipan	6	nach 30 min.	8,387	0,372	+++	113%

Statistische Signifikanz

P < 0,01 = +

P < 0,005 = ++

P < 0,0025 = +++

Tab. V: O₂-Verbrauch isolierter Leberschnitte nach Applikation von Halothan, Luminal und Dimethylnitrosamin

	Zeit	n	Halothan	n	Luminal	n	Dimethyl- nitrosamin
Q O ₂ % σ _P M	in vitro	-	-	11	8,388 113% 0,239 +	6	8,639 116% 0,215 +++
Q O ₂ % σ _P M	1 Tag	-	-	6	8,624 116% 0,501 +	6	7,734 104% 0,191 +
Q O ₂ % σ _P M	2 Tage	5	10,489 141% 0,105 +++	6	5,652 76% 0,221 +++	5	9,074 122% 0,394 +++
Q O ₂ % σ _P M	3 Tage	-	-	12	6,553 88% 0,176 +	-	-
Q O ₂ % σ _P M	4 Tage	5	7,126 96% 0,159	-	5,559 74% 0,142 +++	-	-
Q O ₂ % σ _P M	5 Tage	6	7,386 99% 0,465	-	-	3	9,275 125% 0,226 +++
Q O ₂ % σ _P M	6 Tage	6	6,420 86% 0,306	-	-	-	-
Q O ₂ % σ _P M	7 Tage	6	6,368 85% 0,293 +	6	5,793 78% 1,215 +++	6	9,426 127% 0,385 +++
Q O ₂ % σ _P M	8 Tage	-	-	6	5,382 72% 0,278 +++	5	10,504 141% 0,460 +++
Q O ₂ % σ _P M	5 Wochen	6	5,699 76% 0,292 +++	-	-	-	-

Kontrolle: Q O₂ = 7,416 (n = 38) σ_M = 0,278

Tab. VI: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch Applikation von Halothan (Gehalte pro Gesamtleber)

Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H ^a % d.N.	Q $\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	DPN-H ^b % d.N.	Q $\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	Q $\frac{b}{a}$
Normal	-	72	973	136	0,14	1096	288	0,28	1323	2,16
Halothan 1 x	1 Tag	6	899 92%	138 101%	0,11	1005	435 151%	0,49	1334	4,17
"	2 x	9	1100 113%	126 92%	0,11	1227	367 127%	0,35	1404	3,26
"	3 x	6	1095 112%	158 116%	0,15	1255	368 127%	0,40	1274	2,56
"	4 x	6	1148 117%	150 110%	0,14	1308	400 138%	0,32	1662	2,79
"	5 x	9	1216 124%	158 116%	0,12	1375	524 147%	0,29	1641	2,42
"	6 x	6	1238 127%	173 127%	0,14	1418	418 145%	0,31	1608	2,25

DPN-H^a = alkalische Extraktion

DPN-H^b = alkal.-alkoh. Extraktion

Tab. VII: Fortsetzung von Tab. VI

Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H ^a % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$	DPN	DPN-H ^b % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$	DPN	Q $\frac{b}{a}$
Halothan	7 x	7 Tage	6 1500 154%	246 180%	0,16	1746	480 166%	0,29	2071	2,21
"	8 x	8 Tage	6 1381 141% +	198 145%	0,14	1581	508 176%	0,38	1850	2,57
"	9 x	9 Tage	6 1405 144%	209 153%	0,14	1616	539 187% ++	0,29	1931	2,57
"	10 x	10 Tage	3 1449 148%	231 169%	0,16	1682	521 180%	0,36	1971	2,26
"	11 x	11 Tage	3 1373 141%	245 180%	0,18	1624	594 206%	0,42	1969	2,44
"	12 x	12 Tage	6 1400 143%	228 167%	0,15	1630	676 234%	0,48	2076	3,02
"	20 x	20 Tage	6 1513 155%	198 145%	0,12	1711	507 176%	0,33	2023	2,72
"	30 x	30 Tage	3 1260 129%	-	-	-	556 193%	0,46	1819	-

Tab. VIII: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber
durch Applikation von Halothan (Gehalte pro Gesamtleber

Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H _a % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	TPN-H _b % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	Q $\frac{b}{a}$
Normal	-	72	110	246	2,28	356	501	4,72	606	2,02
Halothan 1 x	1 Tag	6	101 91%	277 112%	2,78	379	500 99%	4,32	617	1,86
"	2 x	9	104 94%	272 110%	2,66	377	464 92%	4,59	566	1,82
"	3 x	6	99 90%	296 120%	3,05	397	450 89%	5,44	539	1,57
"	4 x	6	76 69%	253 102%	3,72	329	581 115%	6,12	677	2,10
"	5 x	9	113 102%	256 104%	2,24	372	509 101%	4,50	620	1,91
"	6 x	6	104 94%	312 126%	3,09	418	692 138%	5,75	816	2,06

TPN-H_a = alkalische Extraktion

TPN-H_b = alkalisch-alkohol. Extraktion

Tab. IX: Fortsetzung von Tab. VIII

Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H % d.N. ^a	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	TPN-H % d.N. ^b	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$
Haloethan	7 x	6	126 114%	299 121%	2,39	423	814 162%	5,65	953	2,87
"	8 x	6	155 140%	346 140%	2,28	506	707 141%	4,52	865	1,93
"	9 x	6	184 167%	358 145%	1,81	544	627 125%	4,14	883	1,94
"	10 x	3	126 114%	336 136%	2,72	460	609 121%	5,05	736	1,83
"	11 x	3	189 171%	333 135%	1,77	524	752 150%	3,94	954	2,25
"	12 x	6	162 147%	342 139%	2,15	507	551 109%	3,39	714	1,61
"	20 x	6	171 155%	323 131%	1,79	477	619 123%	3,64	775	2,01
"	30 x	3	138 125%	240 97%	1,74	379	563 112%	4,05	702	2,49

Tab. X: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidgehalte der Mäuseleber durch chronische Applikation von 0,1 g/kg Luminal (Gehalte pro 1 g Leber)

Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$	DPN	TPN % d.N.	TPN-H % d.N.	Q $\frac{TPN-H}{TPN}$	TPN	TPN % d.N.
Normal		31	769	127	0,16	896	87	227	2,94	311	
Luminal	1 x	12	832 108%	164 129% +++	0,19	996	79 90%	168 74% +++	2,11 71%	248 79%	
"	2 x	9	720 93%	107 84%	0,14	827	79 90%	157 69% +++	1,98 67%	236 75%	
"	3 x	9	721 93%	121 195%	0,16	842	62 71% +++	171 75% +++	2,75 93%	233 74%	
"	4 x	9	691 89%	99 77% ++	0,14	790	71 81% ++	165 72% +++	2,32 78%	236 75%	
"	6 x	2	-	100 78%	-	-	-	167 73%	-	-	

Tab. XI: Fortsetzung von Tab. X

	Dosis	5 Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$	DPN	TPN % d.N.	TPN-H % d.N.	Q $\frac{TPN-H}{TPN}$	TPN-H % d.N.	TPN % d.N.
Luminal	7 x	7 Tage	5	641 83%	120 94%	0,18	762	83 95%	160 70%	1,95 66%	243 78%	243 78%
"	8 x	8 Tage	2	-	156 122%	-	-	85 97%	177 77%	2,07 70%	263 84%	263 84%
"	10 x	10 Tage	3	643 83%	-	-	-	96 110%	138 60%	1,43 48%	234 75%	234 75%
"	11 x	11 Tage	2	776 100%	148 166%	0,18	924	99 113%	185 81%	1,84 62%	284 91%	284 91%

Statistische Signifikanz: $p < 0,01$ = +
 $p < 0,005$ = ++
 $p < 0,0025$ = +++

Tab. XII: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch chronische Applikation von 0,1 g/kg Luminal (Gehalte pro Gesamtleber)

	Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H % d.N.	DPN % d.N.	TPN % d.N.	TPN-H % d.N.	TPN % d.N.	Lebergew. (g)	Lebergew. Q Mausgew.
Normal			31	1218	201	1419	137	359	496	1,585	0,045
Luminal	1 x	1 Tag	12	1389 114%	273 135%	1662 117%	131 95%	280 77%	411 82%	1,670	0,052
"	2 x	2 Tage	9	1320 108%	196 97%	1516 106%	144 105%	287 79%	431 86%	1,834	0,058
"	3 x	3 Tage	9	1288 105%	216 107%	1504 105%	110 80%	305 84%	415 83%	1,787	0,061
"	4 x	4 Tage	9	1189 97%	170 84%	1359 95%	122 89%	283 78%	405 81%	1,721	0,058
"	7 x	7 Tage	5	1314 107%	246 122%	1560 109%	170 124%	328 91%	498 100%	2,050	0,062
"	10 x	10 Tage	3	1332 109%	-	-	196 143%	286 79%	482 97%	2,073	0,069

Tab. XIII: Beeinflussung der Nucleinsäuregehalte, der freien Nucleotide, der Glucose-6-phosphatgehalte und der Proteingehalte der Mäuseleber nach mehrmaliger Applikation von 0,1 g/kg Luminal (Gehalte pro Gesamtleber)

	Dosis	Zeit	n	RNS	DNS	Protein	Glucose-6-phosphat	Gesamt-nucleotide
Normal	-	-	31	824 37	302 15,2	223 13,0	931	1390
Luminal	1 x	24 h	12	803 36 97%	256 9,5 84% +	189 9,5 84%	816 87%	1490 104%
Veränd. P								
"	2 x	2 Tage	9	1048 78,5 127% ++	322 32,4 106%	236 5,9 105%	2085 223%	1547 111%
"	3 x	3 Tage	9	942 44 114%	320 15 105%	255 24 113%	1429 153%	1456 105%
"	4 x	4 Tage	9	993 119 110%	326 36 107%	233 19 104%	1056 113%	1712 123%
"	7 x	7 Tage	5	1070 129%	293 97%	319 142%	885 95%	1849 133%
"	10 x	10 Tage	3	1297 157%	363 120%	275 122%	1017 109%	1728 124%

Tab. XIV: Beeinflussung der Nucleinsäuregehalte, der freien Nucleotide, der Glucos-6-phosphatgehalte und der Proteingehalte der Mäuseleber nach Applikation von 0,1 g/kg Luminal (Gehalt pro 1 g Leber)

Dosis	Zeit	n	RNS μM % d.N.	DNS μM % d.N.	Protein μM % d.N.	Glucose-6- phosphat μM % d.N.	Gesamt= nucleotide μM % d.N.
Normal	-	31	5,358 0,12	1,938 0,05	138 2,2	588 19,6	877 16
Luminal 1 x	24 h	12	4,833 0,101 +++	1,556 0,055 +++	114 5,7 +++	489 26,1 +++	869 15,3
2 x	2 Tage	9	5,656 0,20 105%	1,741 0,07 89%	143 216 103%	1137 170,0 193%	844 24 96%
3 x	3 Tage	9	5,327 0,18 99%	1,820 0,07 93%	141 6,1 102%	800 44,4 136%	815 12 92%
4 x	4 Tage	9	5,341 0,24 99%	1,688 0,11 87%	136 316 98%	614 59,0 104%	895 28 102%
6 x	6 Tage	2	-	1,834 94%	132 95%	564 95%	797 90%
7 x	7 Tage	5	5,014 93%	1,439 74%	149 107%	432 73%	902 102%
8 x	8 Tage	2	-	1,378 71%	-	-	888 101%
10 x	10 Tage	3	6,259 116%	1,758 90%	141 102%	491 83%	834 95%
11 x	11 Tage	2	5,591 104%	1,831 94%	-	464 78%	839 95%

Tab. XV: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch Applikation von Halothan (Gehalte pro 1 g Leber)

Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H _a % d.N.	Q $\frac{TPN-H}{TPN}$ % d.N.	TPN % d.N.	TPN-H _b % d.N.	Q $\frac{TPN-H}{TPN}$ % d.N.	TPN % d.N.	Q $\frac{b}{a}$ %
Normal	-	72	84	187	2,28	271	381	4,72	461	2,03
Halothan	1 x	6	80 95%	218 116%	2,78 121%	299 110%	394 103%	4,32 91%	486 105%	1,86 92%
"	2 x	9	81 96%	211 112%	2,66 116%	292 107%	359 94%	4,59 97%	438 95%	1,82 90%
"	3 x	6	73 86%	217 116% +++	3,05 133%	291 107%	333 87%	5,44 115%	395 85%	1,57 77%
"	4	6	53 63% +++	175 93%	3,72 163%	288 84%	402 105%	6,12 129%	468 101%	2,10 99%
"	5 x	9	68 80% +++	154 82% +++	2,24 98%	224 82%	306 80%	4,50 95%	373 80%	1,91 94%
"	6 x	6	63 75%	189 101%	3,09 135%	253 93%	419 109%	5,57 118%	494 107%	2,06 101%

Statistische Signifikanz: P < 0,01 = + P < 0,005 = ++ P < 0,0025 = +++

Tab. XVI: Fortsetzung von Tab. XV

Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H ^a % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$ % d.N.	TPN % d.N.	TPN-H ^b % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$ % d.N.	TPN % d.N.	Q $\frac{b}{a}$ % d.N.
Halothan	7 x	7 Tage	6	64 76% +++	152 81% +++	2,39 104% +	215 79% +	413 108% +	5,65 119% +	2,87 142% +
"	8 x	8 Tage	6	72 85% +	161 86% +	2,28 100% +	235 86% +	359 94% +	4,52 95% +	1,93 95% +
"	9 x	9 Tage	6	96 114% +	186 99% +	1,81 79% +	283 104% +	362 95% +	4,14 87% +	1,94 96% +
"	10 x	10 Tage	3	75 89% +	197 105% +	2,72 119% +	272 100% +	360 94% +	5,05 106% +	1,83 90% +
"	11 x	11 Tage	3	95 113% +	167 89% +	1,77 77% +	263 97% +	377 98% +	3,94 83% +	2,25 111% +
"	12 x	12 Tage	6	85 101% +	179 95% +	2,15 94% +	265 97% +	288 75% +	3,39 71% +	1,61 79% +
"	20 x	20 Tage	6	97 115% +	183 97% +	1,79 78% +	270 99% +	350 91% +	3,64 77% +	2,01 99% +
"	30 x	30 Tage	3	83 98% +	144 77% +	1,74 76% +	227 83% +	337 88% +	4,05 85% +	2,49 123% +

Tab. XVII: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidgehalte der Mäuseleber durch Applikation von Haloethan (Gehalte pro 1 g Leber)

Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H _a % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$ % d.N.	DPN % d.N.	DPN-H _b % d.N.	Q $\frac{DPN-H}{DPN}$ % d.N.	DPN	Q $\frac{b}{a}$ % d.N.
Normal	-	72	740	104	0,14	833	219	0,28	1006	2,16
Haloethan	1 x	1 Tag	6 708 95%	109 104%	0,11	815	343 156%	0,43	1051	4,17
"	2 x	2 Tage	9 851 119% +++	98 94%	0,11	949	284 129% +++	0,35	1086	3,26
"	3 x	3 Tage	6 802 108%	116 111%	0,15	919	270 123%	0,40	933	2,56
"	4 x	4 Tage	6 794 107%	104 100%	0,14	904	277 126%	0,32	1149	2,79
"	5 x	5 Tage	9 731 98%	95 91%	0,12	827	225 102%	0,29	986	2,42
"	6 x	6 Tage	6 749 101%	105 100%	0,14	858	253 115%	0,31	973	2,25
"	7 x	7 Tage	6 761 102%	125 120% +++	0,16	886	244 111%	0,30	1051	2,21

Tab. XVIII: Fortsetzung von Tab. XVII

Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H _a % d.N.	Q	$\frac{\text{DPN-H}}{\text{Q}}$	DPN	DPN-H _b % d.N.	Q	$\frac{\text{DPN-H}}{\text{Q}}$	DPN	Q $\frac{a}{b}$
Halothan	8 x	8 Tage	6	641 86% +	92 88%	0,14	734	258 117%	0,38	939	2,57	
"	9 x	9 Tage	6	730 98%	109 104%	0,14	840	277 126% ++	0,29	1004	2,57	
"	10 x	10 Tage	3	856 115%	137 131%	0,16	994	308 140%	0,36	1165	2,26	
"	11 x	11 Tage	3	688 92%	123 118%	0,18	814	298 136%	0,42	987	2,44	
"	12 x	12 Tage	6	731 98%	119 114%	0,15	851	353 161%	0,48	1084	3,02	
"	20 x	20 Tage	6	855 115%	112 105%	0,12	967	287 131%	0,33	1143	2,72	
"	30 x	30 Tage	3	754 101%	-	-	-	333 152%	0,46	1088	-	

Tab. XIX: Gehalte der Mäuseleber nach Applikation von Halothan (Gehalte pro Gesamtleber)

	Dosis	Zeit	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide	Lebergew. Mausgewicht
Normal	-	-	72	862	271	183	613	1069	0,052
Halothan	1 x	1 Tag	6	887 102%	270 99%	188 102%	715 116%	1203 112%	0,056 + 7%
"	2 x	2 Tage	9	989 114%	281 103%	186 101%	611 99%	1083 101%	0,056 + 7%
"	3 x	3 Tage	6	862 100%	282 104%	183 100%	696 113%	1194 111%	0,058 + 11%
"	4 x	4 Tage	6	975 113%	275 101%	219 119%	652 106%	1195 111%	0,062 + 19%
"	5 x	5 Tage	9	1031 119%	305 112%	255 139%	704 114%	1329 124%	0,065 + 25%
"	6 x	6 Tage	6	962 111%	321 118%	258 140%	538 87%	1320 123%	0,061 + 17%
"	7 x	7 Tage	6	1105 128%	347 128%	271 148%	707 115%	1635 152%	0,073 + 40%

Tab. XX: Fortsetzung von Tab. XIX

	Dosis	Zeit	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide	Lebergew. Mausgewicht
Halothan	8 x	8 Tage	6	979 113%	324 119%	272 148%	731 119%	1555 145%	0,079 + 51%
"	9 x	9 Tage	6	1103 127%	348 128%	294 160%	650 106%	1519 142%	0,076 + 46%
"	10 x	10 Tage	3	930 107%	285 105%	257 140%	592 96%	1351 126%	0,068 + 30%
"	11 x	11 Tage	3	1261 146%	311 114%	261 142%	536 87%	1933 180%	0,069 + 32%
"	12 x	12 Tage	6	1149 133%	329 121%	291 159%	496 80%	1567 146%	0,076 + 46%
"	20 x	20 Tage	6	1018 118%	328 121%	238 130%	587 95%	1442 134%	0,070 + 34%
"	30 x	30 Tage	3	883 102%	321 118%	330 180%	596 97%	1325 123%	0,066 + 26%

Tab. XXI: Gehalte der Mäuseleber nach Applikation von Halothan (Gehalte pro 1 g Leber)

	Dosis	Zeit	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide
Normal	-	-	72	6,837	2,102	143	466	813
Halothan	1 x	1 Tag	6	6,713 98%	2,052 97%	149 104%	563 120%	947 116%
"	2 x	2 Tage	9	7,394 108%	2,138 101%	145 101%	473 101%	838 103%
"	3 x	3 Tage	6	4,133 75%	2,089 99%	134 93%	510 109%	842 103%
"	4 x	4 Tage	6	6,405 93%	1,914 91%	152 106%	451 96%	826 101%
"	5 x	5 Tage	9	6,240 91%	1,825 86%	147 102%	423 90%	799 98%
"	6 x	6 Tage	6	0,012 88% +++	1,894 90% +++	144 100%	326 69% +++	799 98%
"	7 x	7 Tage	6	5,818 85% +++	1,848 87% +++	138 96%	359 88% +++	830 102%

Tab. XXII: Fortsetzung von Tab. XXI

Dosis	Zeit	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide
Halothan	8 x	8 Tage	6	5,571 81% +++	1,778 84% +	138 96% +++	372 79% 789 97%
"	9 x	9 Tage	6	5,763 84% +++	1,823 86% +++	153 106%	338 72% 790 97%
"	10 x	10 Tage	3	5,536 80%	1,704 81%	152 106%	350 75% 799 98%
"	11 x	11 Tage	3	6,330 92%	1,515 72%	131 91%	269 57% 869 106%
"	12 x	12 Tage	6	6,063 88%	1,730 82%	152 106%	259 55% 818 100%
"	20 x	20 Tage	6	5,778 84%	1,880 89%	135 106%	332 71% 815 100%
"	30 x	30 Tage	3	5,291 77%	1,927 91%	183 139%	357 76% 793 97%

Tab. XVIII: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch Applikation von Dimethylnitrosamin (Gehalte pro 1 g Leber)

Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H _a % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	%TPN d.N.	TPN-H _b % d.N.	Q $\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	Q $\frac{b}{a}$
Normal	-	72	84	187	2,28	271	381	4,72	461	2,02
Dimethyl= nitrosamin	7 x	7 Tage	2	162 86%	1,82	251	314 82%	3,52	403	1,93
"	11 x	11 Tage	3	141 75%	1,95	213	336 88%	4,65	408	2,37
"	12 x	12 Tage	6	160 85%	1,82	249	259 67%	3,01	345	1,30
"	14 x	14 Tage	4	212 113%	2,08	323	355 93%	3,85	449	1,60
"	18 x	18 Tage	3	144 77%	1,94	226	375 98%	5,13	455	2,25

TPNH_a = alkalische Extraktion

TPNH_b = alkalisch-alkoholische Extraktion

Tab. XXIV: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidgehalte der Mäuseleber durch Applikation von Dimethylnitrosamin (Gehalte pro Gesamtleber)

	Dosis	Zeit	n	TPN % d.N.	TPN-H _a % d.N.	Q	$\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	TPN-H _b % d.N.	Q	$\frac{\text{TPN-H}}{\text{TPN}}$	TPN	$\frac{b}{a}$
Normal	-	-	72	110	246	2,28	356	501	4,72	606	2,02		
Dimethyl- nitrosamin	7 x	7 Tage	2	115 104%	210 85%	1,82	325	407 81%	3,52	522	1,93		
"	11 x	11 Tage	3	85 77%	168 68%	1,95	253	400 79%	4,65	485	2,37		
"	12 x	12 Tage	6	98 89%	179 72%	1,82	277	290 57%	3,01	388	1,30		
"	14 x	14 Tage	4	111 100%	216 87%	2,08	327	363 72%	3,85	474	1,60		
"	18 x	18 Tage	3	86 78%	152 61%	1,94	238	396 79%	5,13	482	2,25		

TPN-H_a = alkalische Extraktion

TPN-H_b = alkalisch-alkoholische Extraktion

Tab. XXV: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch Applikation von Dimethylnitrosamin (Gehalte pro 1 g Leber)

	Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H _a % d.N.	Q $\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	DPN-H _b % d.N.	Q $\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	Q $\frac{b}{a}$
Normal	-	-	72	740	104	0,14	833	219	0,28	1006	2,16
Dimethyl= nitrosamin	7 x	7 Tage	2	704 95%	157 150%	0,22	861	186 84%	0,26	890	1,18
"	11 x	11 Tage	3	529 71%	76 73%	0,13	605	122 55%	0,22	651	1,68
"	12 x	12 Tage	6	759 102%	75 72%	0,09	829	200 91%	0,26	950	3,06
"	14 x	14 Tage	4	677 91%	97 93%	0,14	754	208 94%	0,29	884	2,13
"	18 x	18 Tage	3	652 88%	97 93%	0,15	749	190 86%	0,29	831	1,79

DPN-H_a = alkalische Extraktion

DPN-H_b = alkalisch-alkoholische Extraktion

Tab. XXVI: Beeinflussung der stationären Pyridinnucleotidegehalte der Mäuseleber durch Applikation von Dimethylnitrosamin (Gehalte pro Gesamtleber)

	Dosis	Zeit	n	DPN % d.N.	DPN-H _a % d.N. ^a	Q	$\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	DPN-H _b % d.N. ^b	Q	$\frac{\text{DPN-H}}{\text{DPN}}$	DPN	Q	$\frac{b}{a}$
Normal	-	-	72	973	136	0,14	0,14	1096	288	0,28	0,28	1323	2,11	
Dimethyl= nitrosan	7 x	7 Tage	2	914 93%	203 149%	0,22	0,22	1117	241 83%	0,26	0,26	1155	1,18	
"	11 x	11 Tage	3	630 64%	90 66%	0,13	0,13	720	145 50%	0,22	0,22	775	1,68	
"	12 x	12 Tage	6	849 87%	84 61%	0,09	0,09	933	224 77%	0,26	0,26	1073	3,06	
"	14 x	14 Tage	4	692 70%	99 72%	0,14	0,14	791	212 73%	0,29	0,29	904	2,13	
"	18 x	18 Tage	3	689 70%	102 75%	0,15	0,15	791	200 69%	0,29	0,29	889	1,79	

DPN-H_a = alkalische Extraktion

DPN-H_b = alkalisch-alkoholische Extraktion

Tab. XXVII: Gehalte nach Applikation von Dimethylnitrosamin (Gehalte pro 1 g Leber)

Zeit	Lebergew. Q Mausgew.	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide	
Normal	7 Tage	0,052	72	6,837	2,102	143	466	813
Dimethyl= nitrosamin	7 Tage	0,051	2	5,534 80%	2,015 95%	-	550 118%	794 97%
"	11 Tage	0,047	3	4,734 60%	2,378 113%	122	814 174%	743 91%
"	12 Tage	0,044	6	6,068 88%	2,256 107%	125 87%	603 129%	722 88%
"	14 Tage	0,040	4	5,637 82%	2,268 107%	126 88%	637 136%	751 92%
"	18 Tage	0,042	3	5,799 84%	2,223 105%	132 92%	512 109%	739 90%

Tab. XXVIII: Gehalte nach Applikation von Dimethylnitrosamin (pro Gesamtleber)

	Zeit	n	RNS % d.N.	DNS % d.N.	Protein % d.N.	Glucose-6- phosphat	Gesamt= nucleotide	Lebergewicht Mausgewicht
Normal	-	72	826	271	183	613	1069	0,052
Dimethyl= nitrosamin	7 Tage	2	718 83%	261 96%	-	714 116%	1055 98%	0,051
"	11 Tage	3	886 102%	285 105%	144 78%	970 158%	886 82%	0,047
"	12 Tage	6	712 82%	263 97%	146 79%	676 110%	809 85%	0,044
"	14 Tage	4	573 66%	231 85%	129 70%	652 106%	768 71%	0,040
"	18 Tage	3	611 70%	235 86%	139 75%	541 88%	781 73%	0,042

Lebenslauf

Am 8. März 1939 wurde ich, Gerhard Bosch, als zweites von fünf Kindern des Arztes Friedrich Wilhelm Bosch und seiner Ehefrau Annemarie, geb. Koch, in Wuppertal geboren. 1940 verzogen wir nach Höxter/Weser, wo ich ab Herbst 1945 die Volksschule besuchte. Seit Oktober 1949 wohnen wir in Laasphe/Lahn. Hier besuchte ich bis zum Jahr 1952 die Volksschule und danach das Staatliche Aufbaugymnasium. Im März 1958 bestand ich das Abitur. Im Sommersemester 1958 begann ich an der Universität in Bonn das Medizinstudium und bestand die Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1959. Auf Grund eines Austauschstipendiums hielt ich mich vom Sommersemester 1960 bis zum Sommersemester 1961 in Chile auf und arbeitete dort am Institut für Pathologische Physiologie der Universität Concepción. Nach meiner Rückkehr bestand ich im April 1962 in Bonn das Physikum. Im Wintersemester 1962/63 studierte ich in Wien. Vom Sommersemester 1963 ab studierte ich in Marburg, wo ich im Oktober 1965 das Medizinische Staatsexamen bestand. Im Februar 1965 heiratete ich Frl. Gabriele Brinkmann. Seit 1. Dezember 1965 bin ich im Bezirkskrankenhaus Forbach/Baden als Medizinalassistent tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

An der Universität Bonn: Bayer, Böhm, Danneel, Dirscherl, Elsässer, von Eiff, Hagen, Hamperl, Helferich, Heymer, Imdahl, Janker, Klensch, Korth, Lange, Langendörfer, Leischner, Mundt, Oberhoffer, Osberghaus, Paul, Penitschka, Riezler, Rohdewald, Schaede, Schmitz, Schumacher, Schriefers, Steudel, Stöhr, Tünnerhoff, Vorlaender, Wachholder, Weitbrecht, Zeh.

An der Universität Wien: Antoine, Asperger, Braitenberg, Chari, Gitsch, Kunz, Lauda, Neuhold, Novotny, Obiditsch-Mayer.

An der Universität Marburg: Beckmann, Behrend, Braun-Falco, Dittrich, Dölle, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Hettler, Heuser, Hornung, Hildebrandt, Jacob, Kottmeyer, Krönke, Lang, Linneweh, Lübbers, Marx, Maurath, du Mesnil, Neubauer, Oehme, Oehmig, Rodeck, Rohen, Sauer, Schermuly, Schmid, Schwaiger, Schleyer, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher, Wegerle, Würterle.

